

AD

[Document name] Specification

[Title of the Invention] Non-reducing saccharide-forming enzyme, and its preparation and uses

[Claims] 1. A non-reducing saccharide-forming enzyme which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure when allowed to act on a reducing partial starch hydrolysate.

2. The enzyme of claim 1, characterized in that wherein said reducing partial starch hydrolysate is one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, and said non-reducing saccharide is a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit.

3. The enzyme of claim 1 or 2, characterized in that it is derived from a microorganism.

4. The enzyme of claim 3, wherein said microorganism is a member selected from the group consisting of those of the genera *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Curtobacterium*, *Mycobacterium* and *Terrabacter*.

5. An enzyme which has the following physicochemical properties:

(1) Action

Forming a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a

degree of glucose polymerization of 3 or higher;

(2) Molecular weight

About 76,000-87,000 daltons on sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(3) Isoelectric point (pI)

About 3.6±4.6 on isoelectrophoresis using ampholyte;

(4) Optimum temperature

About 35-40°C when incubated at pH 7.0 for 60 min;

(5) Optimum pH

About 6.4-7.2 when incubated at 40°C for 60 min;

(6) Thermal stability

Stable up to a temperature of about 35-40°C when incubated at pH 7.0 for 60 min; and

(7) pH Stability

Stable at a pH of about 5.5-11.0 when incubated at 25°C for 16 hours.

6. A non-reducing saccharide-forming enzyme which has an activity to form a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, and has one or more

partial amino acid sequences selected from the group consisting of:

- (1) X_1 -arginine-threonine-proline- X_2 -serine-threonine-tyrosine-arginine-leucine-
(wherein the symbol " X_1 " means valine or methionine, and the symbol " X_2 " means alanine or valine);
- (2) glycine-valine-glutamic acid-aspartic acid-threonine-alanine-phenylalanine-phenylalanine-arginine-tyrosine-;
- (3) leucine-valine-glutamine-leucine-threonine-methionine-proline-glycine-valine-proline;
and
- (4) glutamic acid-glycine-arginine- X_3 -serine- X_4 -tyrosine-alanine- X_5 -alanine-
(wherein the symbol " X_3 " means glycine or glutamine; " X_4 ", proline or arginine; and " X_5 ", valine or glutamic acid).

7. A process for preparing a non-reducing saccharide-forming enzyme which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure when allowed to act on a reducing partial starch hydrolysate, c h a r a c t e r i z e d in that it comprises culturing in a nutrient culture medium a microorganism capable of producing said enzyme; and recovering said enzyme from the resultant culture.

8. The microorganism of claim 7, which is a member

selected from the group consisting of those of the genera *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Curtobacterium*, *Mycobacterium* and *Terrabacter*.

9. A process for preparing a non-reducing saccharide-forming enzyme which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, c h a r a c t e r i z e d in that it comprises culturing in a nutrient culture medium a microorganism capable of producing said enzyme; and recovering said enzyme from the resultant culture.

10. A microorganism capable of producing a non-reducing saccharide-forming enzyme selected from the group consisting of *Rhizobium* sp. M-11 (FERM BP-4130), deposited in Fermentation Research Institute Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan; and *Arthrobacter* sp. Q36 (FERM BP-4316), deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan.

11. A method to decrease a reducing power of a reducing partial starch hydrolysate, c h a r a c t e r i z e d in that it contains a step of allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme, which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, to act on a

solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher.

12. A non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit or a relatively-low reducing saccharide containing said non-reducing saccharide, said non-reducing saccharide or said relatively-low reducing saccharide being obtainable by allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme, which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher.

13. A non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit or a relatively-low reducing saccharide containing said non-reducing saccharide, said non-reducing saccharide or said relatively-low reducing saccharide being obtainable by allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme, which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher obtainable by a partial hydrolysis of starch.

14. A non-reducing saccharide having a trehalose

structure as an end unit, which is obtainable by allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme, which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates in order to obtain a solution containing said non-reducing saccharide and other concomitant saccharides; subjecting the solution to column chromatography using a strongly-acidic cation-exchange resin to increase the content of said non-reducing saccharide; and recovering the resultant with an increased content of said non-reducing saccharide.

15. A composition containing a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit or a relatively-low reducing saccharide containing said non-reducing saccharide, said non-reducing saccharide or said relatively-low reducing saccharide being obtainable by allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme, which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates, to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher.

16. The composition of claim 15, which is a food product, a cosmetic or a pharmaceutical.

17. A trehalose which is obtainable by allowing a

non-reducing saccharide-forming enzyme, which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher; and allowing glucoamylase or α -glucosidase to act on the resultant mixture.

18. The trehalose of claim 17, which is hydrous- or anhydrous-crystalline trehalose.

19. A trehalose which is obtainable by allowing a non-reducing saccharide-forming enzyme, which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates in order to form non-reducing saccharides having a trehalose structure in their end units; allowing glucoamylase or α -glucosidase to act on the resultant mixture containing said saccharides to obtain a solution containing trehalose and other concomitant saccharides; and subjecting the solution to column chromatography using a strongly-acidic cation-exchange resin to increase the content of said trehalose; and recovering the resultant with an increased content of trehalose.

20. A composition which contains trehalose, said trehalose being obtainable by allowing a non-reducing

saccharide-forming enzyme, which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates, to act on a solution containing one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher; allowing glucoamylase to act on the resultant mixture to form trehalose; and incorporating the resultant trehalose into a product.

21. The composition of claim 20, which is a food product, a cosmetic or a pharmaceutical.

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the invention]

The present invention relates to a novel non-reducing saccharide-forming enzyme, and its preparation and uses, more particularly, to a novel non-reducing saccharide-forming enzyme which forms a non-reducing saccharide having a trehalose structure when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, as well as to its preparation and a microorganism capable of producing said enzyme. The present invention further relates to a composition containing a non-reducing saccharide having a trehalose structure as an end unit which is preparable with said enzyme, a relatively-low reducing saccharide containing said non-reducing saccharide, and/or trehalose prepared from these saccharides.

[Prior art]

Trehalose or α , α -trehalose has been known for long

as a non-reducing saccharide consisting of glucoses. As described in *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol.18, pp.201-225 (1963), published by Academic Press, USA, and *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.56, pp.3,213-3,215 (1990), trehalose widely exists in microorganisms, mushrooms, insects, etc., though the content is relatively low. Since non-reducing saccharides including trehalose do not react with substances containing amino groups such as amino acids and proteins, they neither induce the amino-carbonyl reaction nor alter amino acid-containing substances. Thus, non-reducing saccharides have been deemed to be used without a fear of causing an unsatisfiable browning and deterioration. Because of these, it has been in great demand to establish a preparation of such a non-reducing saccharide.

In conventional preparations of trehalose, as disclosed in Japanese Patent Laid-Open No.154,485/75, microorganisms are utilized or as proposed in Japanese Patent Laid-Open No.216,695/83, maltose is converted into trehalose by using maltose- and trehalose-phosphorylases in combination. The former, however, is not suitable for industrial-scale preparation because the content of trehalose present in microorganisms as a starting material is usually lower than 15 w/w % (the wording "w/w %" will be abbreviated as "%" in the specification, if specified otherwise), on a dry solid basis (d.s.b.), and the extraction and purification steps are complicated. The latter has the following demerits: Since

trehalose is formed via glucose-1-phosphate, maltose as a substrate could not be used at a relatively-high concentration; (ii) the enzymatic reaction systems of the phosphorylases are reversible reactions, and the yield of the objective trehalose is relatively low; and (iii) it is substantially difficult to retain their reaction systems stably and to continue their enzymatic reactions smoothly. Thus, it has not yet been realized as an industrial-scale preparation.

As regards the preparation of trehalose, it is reported in the column titled "Oligosaccharides" in the chapter titled "Current Status of Starch Application Development and Related Problems" in "*Food Chemicals*", No.88, pp.67-72 (August, 1992) that "In spite of a wide applicability of trehalose, an enzymatic preparation thereof via a direct saccharide-transfer reaction or a hydrolytic reaction has been reported to be scientifically almost impossible in this field." Thus, an enzymatic preparation of trehalose by using starch as a material has been deemed to be scientifically very difficult.

It is known that partial starch hydrolysates prepared from starch as a material such as liquefied starch, cyclodextrins and maltooligosaccharides usually contain reducing end-groups in their end units. These partial starch hydrolysates are referred to as "non-reducing partial starch hydrolysates" in the specification. The reducing power of such reducing partial starch hydrolysates is generally expressed by "Dextrose Equivalent (DE) value", based on their dry solid. It is known that among reducing partial starch hydrolysates

those with a relatively-high DE generally have a decreased molecular weight and viscosity, as well as a relatively-high level of sweetness and reactivity, and readily react with substances having amino groups such as amino acids and proteins to cause an unsatisfiable browning, smell and deterioration of their quality.

These properties of reducing partial starch hydrolysates are varied dependently on their DE values, and the relationship between reducing partial starch hydrolysates and their DE values is very important. It has been even believed to be impossible to break away the relationship in this field.

The only way to break away the relationship is a method to form non-reducing saccharides from reducing partial starch hydrolysates by hydrogenating the hydrolysates at a relatively-high pressure of hydrogen to convert their reducing end-groups into hydroxyl groups. The method, however, requires a high-pressure autoclave and consumes excessive amounts of hydrogen and energy, as well as a relatively-high level of control or safety facility to prevent disasters. The material reducing partial starch hydrolysates and the resultant products differ because the former consists of glucose units and the latter, i.e. sugar alcohols of the resultant partial starch hydrolysates, consists of glucose and sorbitol units which may cause symptoms such as digestive disorder and diarrhea when administered to the body. Thus, it has been in great demand to establish a method to decrease or even eliminate a reducing power of reducing partial starch hydrolysates without changing

the chemical structure of glucose as a constituent saccharide thereof.

[Object of the invention]

The present invention is to provide a novel non-reducing saccharide, and its uses and preparations from reducing partial starch hydrolysates in order to break away a conventionally believed relationship between reducing partial starch hydrolysates and their DE and to explore a novel applicability of such a non-reducing partial saccharide.

[Means to attain the object]

In order to attain the aforementioned object, the present inventors have extensively screened microorganisms capable of producing a novel non-reducing saccharide-forming enzyme, which forms non-reducing saccharides having a trehalose structure when allowed to act on reducing partial starch hydrolysates, in the belief that such an enzyme should exist. As a result, we isolated novel microorganisms of the genera *Rhizobium*, named as "*Rhizobium* sp. M-11", and *Arthrobacter*, named as "*Arthrobacter* sp. Q36", from the respective soils in Okayama-city, Okayama, Japan, and in Soja-city, Okayama, Japan; and found that the microorganisms produce a novel non-reducing saccharide-forming enzyme which forms non-reducing saccharides having a trehalose structure when allowed to act on reducing partial starch hydrolysates, and that the objective non-reducing saccharides are readily prepared when the enzyme is allowed to act on reducing partial starch hydrolysates. We

also found that trehalose is readily preparable by first allowing the enzyme to act on reducing partial starch hydrolysates, then subjecting the resultant non-reducing saccharide to the action of glucoamylase or α -glucosidase. Thus, the present inventors accomplished this invention. We also extensively screened microorganisms capable of producing the non-reducing saccharide-forming enzyme from conventional microorganisms. As a result, it was found that microorganisms of the genera *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Curtobacterium* and *Terrabacter* produce the present non-reducing saccharide-forming enzyme similarly as the microorganisms of the genera *Rhizobium* and *Arthrobacter*, and the present inventors accomplished this invention. We also established preparations of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals containing the present non-reducing saccharides, relatively-low reducing saccharides which contain the non-reducing saccharides, and/or trehalose prepared from these saccharides, and accomplished this invention.

The identification test of a microorganism of the genus *Rhizobium*, i.e. "*Rhizobium* sp. M-11" according to the present invention gave the following results. The test was conducted in accordance with the method as described in "*Biseibutsu-no-Bunrui-to-Dotei*" (Classification and Identification of Microorganisms), edited by Takeji Hasegawa, published by Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan (1985).

A. Morphology

Characteristics of cells when incubated at 27°C
in nutrient agar

Usually existing a rod form of 0.6-0.8x1.0-
1.5µm;

Existing single but uncommonly existing in a
coupled- or linked-form;

Exhibiting no polymorphism;

Possessing motility, asporogenicity and
flagellum;

Non-acid fast;

Gram stain : Negative;

Capsule : Negative;

Metachromatic granule : Positive; and

Accumulating poly-β-hydroxy butyrate.

B. Cultural property

(1) Characteristics of colony formed when
incubated at 27°C in nutrient agar plate

Shape : Circular colony having a
diameter of about 1.5mm after
24-hours incubation;

Rim : Entire;

Projection : Plane or hemispherical shape;

Gloss : Positive;

Surface : Smooth; and

Color : Creamy and Semitransparent;

(2) Characteristics of colony formed when

incubated at 27°C in agar plate with dextrose and trypton

Creamy and semitransparent colony with mucoid;

- (3) Characteristics of colony formed when incubated at 27°C in agar plate with yeast extract and mannitol

Shape : Circular colony having a diameter of about 3mm after 5-days incubation; and

Color : Creamy and semitransparent colony with mucoid;

- (4) Characteristics of colony formed when incubated at 27°C in agar plate with yeast extract, mannitol and congo red

Exhibiting a pale pink and a substantial no absorption of congo red;

- (5) Growing at 27°C in agar plate with yeast extract, mannitol and 2 w/v % NaCl;

- (6) Characteristics of colony formed when incubated at 27°C in slant nutrient agar

Growth : Satisfiable;

Shape : Thread-like; and

- (7) Not liquefying gelatin when stab-cultured at 27°C in nutrient gelatin.

C. Physiological properties

- (1) Reduction of nitrate : Positive

- (2) Denitrification reaction : Negative
- (3) Methyl red test : Negative
- (4) VP-test : Negative
- (5) Formation of indole : Negative
- (6) Formation of hydrogen sulfide : Positive
- (7) Hydrolysis of starch : Negative
- (8) Utilization of citric acid : Positive
- (9) Utilization of inorganic nitrogen source:
Utilizing ammonium salts and nitrates;
- (10) Formation of pigment : Forming no soluble
pigment;
- (11) Urease : Positive
- (12) Oxidase : Negative
- (13) Catalase : Positive
- (14) Growth conditions : Growing at a pH in the
range of 5.5-9.0 and a temperature in the
range of 4-35°C;
- (15) Oxygen requirements : Aerobic
- (16) Utilization of carbon source and acid
formation

Carbon source	Utilization	Acid formation
D-Glucose	+	+
D-Galactose	+	+
D-Fructose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Xylose	+	+

(Continued)

Carbon source	Utilization	Acid formation
L-Rhamnose	+	+
Maltose	+	-
Sucrose	+	+
Lactose	+	-
Trehalose	+	-
Raffinose	+	+
Mannitol	+	-
Dextrin	+	-
Dulcitol	+	-

(17) Decarboxylase test on amino acid

Negative against L-lysine, L-arginine and L-ornithine;

(18) Utilization of amino acid

Utilizing sodium L-glutamate, sodium L-aspartate, L-histidine and L-proline;

(19) DNase : Negative;

(20) Formation of 3-ketolactose : Negative; and

(21) Mol% guanine (G) plus cytosine (C) of DNA : 61%.

The bacteriological properties were compared with those of known microorganisms with reference to *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th edition (1984). As a result, it was revealed that the present microorganism was identified

as a microorganism of the genus *Rhizobium*. The microorganism is similar to those of the species *Rhizobium meliloti*, but they are distinguishable in the fact that the microorganism utilizes maltose, lactose and mannitol but forms no acid, and it produces an enzyme which forms non-reducing saccharides having a trehalose structure when allowed to act on reducing partial starch hydrolysates. No publications have reported such a microorganism having these properties.

Based on these results, the present inventors named this microorganism "*Rhizobium* sp. M-11", and deposited it on December 24, 1992, in Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan. The deposition of the microorganism was accepted on the same day and has been maintained by the institute under the accession number of FERM BP-4130.

In addition to the above-identified microorganism, other strains of the genus *Rhizobium* and their mutants can be suitably used in the invention as long as they produce the present non-reducing saccharide-forming enzyme.

The identification test of a microorganism of the genus *Arthrobacter*, i.e. *Arthrobacter* sp. Q36 according to the present invention gave the following results. The test was conducted similarly as in *Rhizobium* sp. M-11 in accordance with the method as described in "*Biseibutsu-no-Bunrui-to-Dotei*" (Classification and Identification of Microorganisms), edited by Takeji Hasegawa, published by Japan Scientific Societies

Press, Tokyo, Japan (1985).

A. Morphology

- (1) Characteristics of cells when incubated at 27
in nutrient agar

Usually exhibiting a rod form of 0.5-0.7x0.8-
1.6µm;

Existing single;

Exhibiting polymorphism;

Possessing no motility, flagellum and
asporogenicity;

Non-acid fast;

Gram stain : Positive; and

Capsule : Negative;

- (2) Characteristics of cells when incubated at 27°C
in EYG agar

Exhibiting a rod-coccus cycle.

B. Cultural property

- (1) Characteristics of colony formed when
incubated at 27°C in nutrient agar plate

Shape : Circular colony having a
diameter of about 2-2.5mm after
3-days incubation;

Rim : Entire;

Projection : Hemispherical shape;

Gloss : Moist gloss;

Surface : Smooth; and

Color : Semitransparent and white or pale

yellow;

- (2) Characteristics of cells when slant-cultured at 27°C in nutrient agar plate
Growth rate : Satisfiable; and
Shape : Thread-like;
- (3) Characteristics of cells when slant-cultured at 27°C in agar plate containing yeast extract and peptone
Growth rate : Satisfiable;
Shape : Thread-like; and
- (4) Characteristics of cells when stab-cultured at 27°C in bouillon and gelatin
Liquefying bouillon and gelatin.

C. Physiological properties

- (1) Reduction of nitrate : Positive
- (2) Denitrification reaction : Negative
- (3) Methyl red test : Negative
- (4) VP-test : Positive
- (5) Formation of indole : Negative
- (6) Formation of hydrogen sulfide : Positive
- (7) Hydrolysis of starch : Negative
- (8) Hydrolysis of cellulose : Negative
- (9) Utilization of citric acid : Positive
- (10) Utilization of inorganic nitrogen source:
Utilizing ammonium salts and nitrates;
- (11) Formation of pigment : Negative;
- (12) Urease : Positive;

- (13) Oxidase : Negative;
- (14) Catalase : Positive;
- (15) Growth conditions : Growing at a pH in the range of 5-10 and a temperature in the range of 4-37° C;
- (16) Oxygen requirements : Aerobic;
- (17) Utilization of carbon source and acid formation

Carbon source	Utilization	Acid formation
D-Glucose	+	-
D-Galactose	+	-
D-Fructose	+	-
L-Arabinose	+	-
D-Xylose	+	-
L-Rhamnose	+	-
Maltose	+	-
Sucrose	+	-
Lactose	+	-
Raffinose	+	-
Mannitol	+	-
Dextrin	+	-
Dulcitol	+	-

- (18) Utilization of amino acid
- Utilizing sodium L-glutamate, sodium L-aspartate, L-histidine and L-proline;

- (19) DNase : Positive;
- (20) Formation of 3-ketolactose : Negative;
- (21) Major diamino acid of cell wall :
Lysine; and
- (22) Mol% guanine (G) plus cytosine (C) of DNA
: 63%.

Based on these bacteriological properties, the microorganism was compared with known microorganisms with reference to *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th edition (1984). As a result, it was revealed that the microorganism was identified with a microorganism of the genus *Arthrobacter*. The microorganism has a character that it produces a non-reducing saccharide-forming enzyme having a trehalose structure which forms non-reducing saccharides when allowed to act on reducing partial starch hydrolysates. It has not been reported in any publication.

Based on these results, the present inventors named this microorganism "*Arthrobacter* sp. Q36", and deposited it on June 3, 1993, in National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan. The microorganism was accepted and has been maintained by the institute under the accession number of FERM BP-4316.

In addition to the above-mentioned microorganism, other strains of the genus *Arthrobacter* and their mutants can be suitably used in the invention as long as they produce the

present non-reducing saccharide-forming enzyme having a trehalose structure when allowed to act on reducing partial starch hydrolysates.

Any microorganism can be used in the invention as long as it produces the present enzyme. For example, in addition to the aforementioned *Rhizobium* sp. M-11 (FERM BP-4130) and *Arthrobacter* sp. Q36 (FERM BP-4316), other hitherto known microorganisms such as those of the species *Brevibacterium helvolum* (ATCC 11822), *Flavobacterium aquatile* (IFO 3772), *Micrococcus luteus* (IFO 3064), *Micrococcus roseus* (ATCC 186), *Curtobacterium citreum* (IFO 15231), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 19420) and *Terrabacter tumescens* (IFO 12960) can be arbitrary used in the invention.

Any nutrient culture medium can be used in the invention as long as these microorganisms usable in the invention can grow therein and produce the present non-reducing saccharide-forming enzyme: For example, synthetic- and natural-nutrient culture media can be used as the nutrient culture medium. Any carbon-containing substance can be used in the invention as a carbon source as long as it is utilized by the microorganisms: Examples of such a carbon source are saccharides such as glucose, fructose, lactose, sucrose, mannitol, sorbitol, molasses and reducing partial starch hydrolysates; and organic acids such as citric acid and succinic acid. The concentrations of these carbon sources in nutrient culture media are varied. For example, in the case

of using reducing partial starch hydrolysates, a preferable concentration is usually 20% or lower, more particularly, 5% or lower, d.s.b., in view of the growth of microorganisms. The nitrogen sources usable in the invention are, for example, inorganic nitrogen compounds such as ammonium salts and nitrates; and organic nitrogen-containing substances such as urea, corn steep liquor, casein, peptone, yeast extract and beef extract. The inorganic ingredients usable in the invention are, for example, calcium salts, magnesium salts, potassium salts, sodium salts, phosphates and other salts of manganese, zinc, iron, copper, molybdenum and cobalt. If necessary, amino acids and vitamins can be suitably used in combination.

The microorganisms usable in the invention are cultured under aerobic conditions at a temperature, usually, in the range of 4-40°C, preferably, in the range of 20-37°C; and at a pH in the range of 4-10, preferably, a pH in the range of 5-9. The cultivation time suitably used in the invention is set to a time which is longer than that required for the growth initiation of the microorganisms, preferably, 10-100 hours. The concentration of dissolved oxygen (DO) in nutrient culture media is not specifically restricted, but usually in the range of 0.5-20ppm. The concentration of DO can be kept within the range by means of controlling of aeration, stirring, supplementing oxygen to aeration, and increasing the inner pressure of a fermentor. The cultivation is carried out batchwise or in continuous manner.

After completion of the cultivation of microorganisms, the present enzyme is recovered. Inasmuch as the activity of the present enzyme is found in both cells and cell-free supernatants, these cells and supernatants can be recovered as a crude enzyme. The resultant culture can be also used intact as a crude enzyme. Conventional liquid-solid separation methods can be employed in the invention as a method to remove cells from the culture. For example, methods to directly centrifuge the resultant culture, as well as those to filtrate the culture with precoat filters or to separate cells by membrane filtration using plane filters or follow fibers, can be suitably used. While cell-free filtrates thus obtained can be used intact as an enzyme solution, they may be concentrated prior to their use. The concentration methods usable in the invention are, for example, salting out using ammonium sulfate, sedimentation using acetone and alcohol, and concentration using membranes such as plane filters and follow fibers.

Cell-free filtrates and their concentrates can be subjected to conventional immobilizations. Examples of such conventional methods are conjugation methods using ion exchangers, covalent bondings and absorptions using resins and membranes, and inclusion methods using high-molecular weight substances. Cells separated from the resultant cultures can be used as a crude enzyme without any treatment, or they can be immobilized prior to their use. For example, such cells are immobilized by mixing them with sodium alginate, and dropping

the resultant mixture in calcium chloride solution to gelatinize the drops into granules. The granules thus obtained can be fixed by treating them with polyethylene imine or glutaraldehyde. Extracts from cells can be used in the invention as a crude enzyme solution. For example, a clear crude enzyme solution containing the present enzyme can be prepared by extracting the present enzyme from cells treated with ultrasonic, mechanical disruption using glass beads and alumina, and french-press disruption; and subjecting the resultant extract to centrifugation or membrane filtration.

The crude enzyme solution thus obtained can be used intact or after purification with conventional methods. For example, a purified enzyme preparation exhibiting an electrophoretically single band can be prepared by dialyzing a crude enzyme preparation which had been prepared by salting out a crude enzyme solution with ammonium sulfate and concentrating the resultant; and successively purifying the dialyzed solution on anion-exchange column chromatography using "DEAE Toyopearl[®]", an anion-exchange resin; hydrophobic column chromatography using "Butyl Toyopearl[®]", a hydrophobic resin; and gel filtration chromatography using "Toyopearl[®] HW-55", a resin for gel filtration, all of which are products of Tosoh Corporation, Tokyo, Japan.

The present non-reducing saccharide-forming enzyme thus obtained has the following physicochemical properties:

(1) Action

Forming non-reducing saccharides having a

trehalose structure as an end unit when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher;

(2) Molecular weight

About 76,000±87,000 daltons on sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(3) Isoelectric point (pI)

About 3.6±4.6 on isoelectrophoresis using ampholyte;

(4) Optimum temperature

About 35-40°C when incubated at pH 7.0 for 60 min;

(5) Optimum pH

About 6.4-7.2 when incubated at 40°C for 60 min;

(6) Thermal stability

Stable up to a temperature of about 35-40°C when incubated at pH 7.0 for 60 min; and

(7) pH Stability

Stable at a pH in the range of about 5.5-11.0 when incubated at 25°C for 16 hours.

The activity of the present non-reducing saccharide-forming enzyme is assayed as follows: One ml of an enzyme solution is added to 4ml of 1.25 w/v % maltopentaose in 50mM phosphate buffer (pH 7.0), and the mixture solution is

incubated at 40°C for 60 min. The reaction mixture is heated at 100°C for 10 min to suspend the enzymatic reaction, and the reaction mixture is precisely diluted by 10 times with deionized water, followed by determining the reducing power of the diluted solution on the Somogyi-Nelson's method. As a control, an enzyme solution, which had been heated at 100°C for 10 min to inactivate the enzyme, is treated similarly as above. One unit activity of the present enzyme is defined as the amount of enzyme which eliminates the reducing power of that of one μ mole of maltopentaose per minute when determined with the above-mentioned assay.

Reducing partial starch hydrolysates used as a substrate for the present enzyme are those prepared by partially hydrolyzing amylaceous substances such as starch, amylopectin and amylose with amylases or acids. Such reducing partial starch hydrolysates obtained by the hydrolysis with amylases are those prepared by hydrolyzing amylaceous substances with amylases such as α -amylase, maltotriose forming amylase, maltotetraose forming amylase, maltopentaose forming amylase and maltohexaose forming amylase as disclosed in *Handbook of Amylases and Related Enzymes*, published by Pergamon Press, Tokyo, Japan (1988). In the case of preparing reducing partial starch hydrolysates, debranching enzymes such as pullulanase and isoamylase can be favorably used in combination with the amylases. One or more maltooligosaccharides such as maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose and maltoheptaose can be arbitrary used as a reducing partial

starch hydrolysate.

The concentration of the reducing partial starch hydrolysates used as a substrate in the invention is not specifically restricted. While the present enzymatic reaction proceeds even with a 0.1% solution of a substrate, the enzymatic reaction more favorably proceeds with solutions having a concentration of 2% or higher, preferably, those having a concentration of 5-50% of a substrate, d.s.b. Under these concentrations non-reducing saccharides having a trehalose structure are readily formed in a satisfactorily-high yield. Suspensions containing insoluble substrates can be used in the invention. The reaction temperature used in the present enzymatic reaction can be set to a temperature at which the present enzyme is not inactivated, i.e. a temperature up to about 55°C, preferably, a temperature in the range of 40-50°C. The reaction pH used in the present enzymatic reaction is controlled in the range of 5-10, preferably, in the range of about 6-8. The reaction time used in the present enzymatic reaction is adequately chosen dependently on the conditions of the enzymatic reaction.

The resultant reaction mixtures containing non-reducing saccharides have a reducing power much lower than those of the material reducing partial starch hydrolysates used as a substrate. For example, in the case of using maltopentaose as a substrate, about 93% of the initial reducing power diminishes or the reducing power lowers to about 7% with respect to the initial reducing power.

The resultant reaction mixtures are in the usual manner subjected to filtration and centrifugation in order to remove insoluble substances, and the resultant solutions are decolorized with an activated charcoal, desalted with ion exchangers in H- and OH-form, and concentrated into syrupy products. The syrupy products can be suitably dried into powdery products. If necessary, the powdery products can be readily prepared into non-reducing saccharides with the highest possible purity by purifying the powdery products with one or more methods, for example, column chromatographic fractionations such as ion-exchange column chromatography, column chromatography using an activated charcoal or a silica gel; separations using organic acids such as acetone and alcohol; and alkaline treatments to decompose and remove the remaining reducing saccharides.

More particularly, ion-exchange column chromatography can be suitably used in the invention as an industrial-scale preparation of the objective saccharides. The objective non-reducing saccharides with an improved purity can be arbitrarily prepared by, for example, column chromatography using a strongly-acidic cation exchange resin as described in Japanese Patent Laid-Open Nos.23,799/83 and 72,598/83 to remove concomitant saccharides. In this case, any one of fixed-bed, moving bed, and semi-moving methods can be employed.

If necessary, the present non-reducing saccharides having a trehalose structure or relatively-low reducing saccharides containing the non-reducing saccharides can be

hydrolyzed by amylases such as α -amylase, β -amylase, glucoamylase and α -glucosidase in order to control their sweetness and reducing power or to lower their viscosity; and the resultant products can be further treated with processings wherein the remaining reducing saccharides are hydrogenated into sugar alcohols to diminish their reducing powder.

More particularly, trehalose is readily prepared by allowing glucoamylase or α -glucosidase to act on the present non-reducing saccharides or relatively-low reducing saccharides containing them. A high trehalose content fraction is obtained by allowing glucoamylase or α -glucosidase to act on these saccharides to form a mixture of trehalose and glucose, and subjecting the mixture to the aforementioned purifications such as ion-exchange column chromatography to remove glucose. The high trehalose content fraction can be arbitrary purified and concentrated into a syrupy product, and, if necessary the syrupy product can be concentrated into a supersaturated solution, followed by crystallizing hydrous- or anhydrous-crystalline trehalose and recovering the resultant crystal.

In order to prepare hydrous crystalline trehalose, an about 65-90% solution of trehalose with a purity of about 60% or higher is placed in a crystallizer, and gradually cooled while stirring in the presence of 0.1-20% seed crystal at a temperature of 95°C or lower, preferably, at a temperature in the range of 10-90°C, to obtain a masseccuite containing hydrous crystalline trehalose. Conventional methods such as separation, block pulverization, fluidized-bed granulation and

spray drying can be employed in the invention to prepare from the massecuite hydrous crystalline trehalose or crystalline saccharides containing it.

In the case of separation, massecuites are usually subjected to a basket-type centrifuge to separate hydrous crystalline trehalose from the mother liquor, and, if necessary the hydrous crystalline trehalose is washed by spraying with a small amount of cold water to facilitate the preparation of hydrous crystalline trehalose with an increased purity. In the case of spray drying, crystalline saccharides with no or substantially free of hygroscopicity are readily prepared by spraying massecuites with a concentration of 70-85%, d.s.b., and a crystallinity of about 20-60%, d.s.b., from a nozzle by a high-pressure pump; drying the resultant products with a 60-100°C hot air which does not melt the resultant crystalline powders; and aging the resultant powders for about 1-20 hours while blowing thereto a 30-60°C hot air. In the case of block pulverization, crystalline saccharides with no or substantially free of hygroscopicity are readily prepared by allowing massecuites with a moisture content of 10-20% and a crystallinity of about 10-60%, d.s.b., to stand for about 0.1-3 days in order to crystallize and solidify the whole contents into blocks; and pulverizing or cutting the resultant blocks.

Although anhydrous crystalline trehalose can be prepared by drying hydrous crystalline trehalose to convert it into anhydrous one, it is generally prepared by providing a high trehalose content solution with a moisture content less

than 10%; placing the solution in a crystallizer; keeping the solution in the presence of a seed crystal at a temperature in the range of 50-160°C, preferably, a temperature in the range of 80-140°C under stirring conditions to obtain a massecuite containing anhydrous crystalline trehalose; and crystallizing and pulverizing anhydrous crystalline trehalose by conventional methods such as block pulverization, fluidized-bed granulation and spray drying.

The resultant non-reducing saccharides and relatively-low reducing saccharides containing them according to the present invention have a relatively-lower reducing power and a relatively-higher stability than those of the material reducing partial starch hydrolysates, and because of this these saccharides can be mixed and processed with other materials, especially, amino acids and amino acid-containing substances such as oligopeptides and proteins without a fear of causing an unsatisfiable browning, smell and deterioration of the materials. Unlike reducing partial starch hydrolysates, these saccharides have a relatively-low reducing power and viscosity, and among these saccharides those with a relatively-low degree of glucose polymerization have a satisfactorily-higher quality and more mild sweetness than the hydrolysates.

The present non-reducing saccharides are hydrolyzed by amylases such as α -amylase derived from pancreas into relatively-low molecular weight non-reducing oligosaccharides or maltooligosaccharides, and these oligosaccharides are readily hydrolyzed by α -glucosidase and intestinal enzymes into

glucose and trehalose molecules. The resultant trehalose is readily hydrolyzed by trehalase into glucoses. Thus, the present non-reducing saccharides and relatively-low reducing saccharides containing them, as well as trehalose, can be utilized as an energy source by the body when orally administered. These present saccharides and trehalose are not substantially fermented by dental carries-inducing microorganisms, and this renders them useful as a dental carries-preventing sweetener.

The present non-reducing saccharides and relatively-low reducing saccharides containing them, as well as trehalose, have a satisfiable stability and sweetness, and those in crystalline form can be arbitrary used as a sugar coating material for tablets in combination with binders such as pullulan, hydroxyethyl starch and polyvinylpyrrolidone. These saccharides and trehalose have properties such as osmotic pressure-controlling ability, filler-imparting ability, gloss-imparting ability, moisture-retaining ability, viscosity-imparting ability, substantial no fermentability, ability to prevent retrogradation of gelatinized starch, and ability to prevent crystallization of other saccharides.

Anhydrous crystalline trehalose can be arbitrary used as a desiccant for food products, cosmetics, pharmaceuticals, and their materials and intermediates, and readily formed into compositions in the form of powder, granule and tablet with a satisfiable stability and quality.

Thus, the present non-reducing saccharides and

relatively-low reducing saccharides containing them, as well as trehalose prepared from these saccharides, can be arbitrary used as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer, excipient and desiccant in a variety of compositions such as food products, tobaccos, cigarettes, feeds, pet foods, cosmetics and pharmaceuticals.

The present non-reducing saccharides and relatively-low reducing saccharides containing them, as well as trehalose prepared from these saccharides, can be used intact as a seasoning for sweetening. If necessary, they can be used together with adequate amounts of one or more other sweeteners, for example, powdered syrup, glucose, maltose, sucrose, isomerized sugar, honey, maple sugar, isomaltooligosaccharide, galactooligosaccharide, fructooligosaccharide, lactosucrose, sorbitol, maltitol, lactitol, dihydrocharcone, stevioside, α -glycosyl stevioside, rebaudioside, glycyrrhizin, L-aspartyl L-phenylalanine methyl ester, saccharin, glycine and alanine; and/or a filler such as dextrin, starch and lactose.

The present non-reducing saccharides and relatively-low reducing saccharides containing them, as well as a powdery or crystalline trehalose prepared from these saccharides, can be used intact, or, if necessary they can be mixed with an excipient, filler and binder and formed into granules, spheres, shot-rods, plates, cubes and tablets, prior to their use.

The present non-reducing saccharides, relatively-low reducing saccharides containing them, and trehalose prepared from these saccharides have the following features: (i) They

have a sweetness which well harmonizes with other materials having sour-, acid-, salty-, bitter-, astringent- and delicious-tastes; and (ii) they are highly acid- and heat-resistant. Thus, they can be favorably used in food products in general as a sweetener, taste-improving agent and quality-improving agent.

The present non-reducing saccharides, relatively-low reducing saccharides containing them, and trehalose prepared from these saccharides can be used in seasonings such as amino acids, peptides, soy sauce, powdered soy sauce, "*miso*", "*funmatsu-miso*" (a powdered *miso*), "*moromi*" (a refined sake), "*hishio*" (a refined soy sauce), "*furikake*" (a seasoned fish meal), mayonnaise, dressing, vinegar, "*sanbai-zu*" (a sauce of sugar, soy sauce and vinegar), "*funmatsu-sushi-su*" (powdered vinegar for sushi), "*chuka-no-moto*" (an instant mix for Chinese dish), "*tentsuyu*" (a sauce for Japanese deep-fat fried food), "*mentsuyu*" (a sauce for Japanese vermicelli), sauce, catsup, "*yakiniku-no-tare*" (a sauce for Japanese grilled meat), curry roux, instant stew mix, instant soup mix, "*dashi-no-moto*" (an instant stock mix), nucleic acid condiments, mixed seasoning, "*mirin*" (a sweet sake), "*shin-mirin*" (a synthetic mirin), table sugar and coffee sugar.

Also, the present non-reducing saccharides, relatively-low reducing saccharides containing them, and trehalose prepared from these saccharides can be freely used for sweetening "*wagashi*" (Japanese cakes) such as "*senbei*" (a

rice cracker), "arare-mochi" (a rice-cake cube), "okoshi" (a millet-and-rice cake), "mochi" (a rice paste), "manju" (a bun with a bean-jam), "uiro" (a sweet rice jelly), "an" (a bean jam), "yokan" (a sweet jelly of beans), "mizu-yokan" (a soft adzuki-bean jelly), "kingyoku" (a kind of yokan), jelly, pao de Castella and "amedama" (a Japanese toffee); confectioneries such as bun, biscuit, cracker, cookie, pie, pudding, butter cream, custard cream, cream puff, waffle, sponge cake, doughnut, chocolate, chewing gum, caramel and candy; frozen desserts such as ice cream and sherbet; syrups such as "kajitsu-no-syrup-zuke" (a preserved fruit) and "korimitsu" (a sugar syrup for shaved ice); pastes such as flour paste, peanut paste, fruit paste and spread; processed fruits and vegetables such as jam, marmalade, "syrup-zuke" (fruit pickles) and "toka" (conserves); pickles and pickled products such as "fukujin-zuke" (red colored radish pickles), "bettara-zuke" (a kind of whole fresh radish pickles), "senmai-zuke" (a kind of sliced fresh radish pickles) and "rakkyo-zuke" (pickled shallots); premixes for pickles and pickled products such as "takuan-zuke-no-moto" (a premix for pickled radish) and "hakusai-zuke-no-moto" (a premix for fresh white rape pickles); meat products such as ham and sausage; products of fish meat such as fish ham, fish sausage, "kamaboko" (a steamed fish paste), "chikuwa" (a kind of fish paste) and "tempura" (a Japanese deep-fat fried fish paste); "chinmi" (relish) such as "uni-no-shiokara"

(salted guts of sea urchin), "*ika-no-shiokara*" (salted guts of squid), "*su-konbu*" (processed tangle), "*saki-surume*" (dried squid strips) and "*fugu-no-mirin-boshi*" (a dried mirin-seasoned swellfish); "*tsukudani*" (foods boiled down in soy sauce) such as those of laver, edible wild plants, dried squid, fish and shellfish; daily dishes such as "*nimame*" (cooked beans), potato salad and "*konbu-maki*" (a tangle roll); milk products; canned and bottled products such as those of meat, fish meat, fruit and vegetable; alcoholic beverages such as synthetic sake, wine and liquors; soft drinks such as coffee, tea, cocoa, juice, carbonated beverage, sour milk beverage and beverage containing a lactic acid bacterium; instant food products such as instant pudding mix, instant hot cake mix and "*sokuseki-shiruco*" (an instant mix of adzuki-bean soup with rice cake) and instant soup mix; and beverages such as baby foods, foods for therapy, beverages supplemented with nutrition, peptide foods and frozen foods; as well as for improving the tastes and qualities of the aforementioned food-products.

The present non-reducing saccharides, relatively-low reducing saccharides containing them, and trehalose prepared from these saccharides can be also used in feeds and pet foods for animals such as domestic animals, poultry, honey bees, silk worms and fishes in order to improve their taste preferences. These saccharides and trehalose can be arbitrary used as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent and stabilizer in other products in paste and liquid form such as

a tobacco, cigarette, dentifrice, lipstick, rouge, lip cream, internal medicine, tablet, troche, cod liver oil in the form of drop, cachou, oral refrigerant, gargle, cosmetic and pharmaceutical.

The present non-reducing saccharides, relatively-low reducing saccharides containing them, and trehalose prepared from these saccharides can be used as a quality-improving agent and stabilizer in biologically active substances susceptible to lose their effective ingredients and activities, as well as in health foods and pharmaceuticals containing the biologically active substances. Examples of such a biologically active substance are lymphokines such as α -, β - and γ -interferons, tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor necrosis factor- β (TNF- β), macrophage migration inhibitory factor, colony-stimulating factor, transfer factor and interleukin 2; hormones such as insulin, growth hormone, prolactin, erythropoietin and follicle-stimulating hormone; biological preparations such as BCG vaccine, Japanese encephalitis vaccine, measles vaccine, live polio vaccine, smallpox vaccine, tetanus toxoid, Trimeresurus antitoxin and human immunoglobulin; antibiotics such as penicillin, erythromycin, chloramphenicol, tetracycline, streptomycin and kanamycin sulfate; vitamins such as thiamine, riboflavin, L-ascorbic acid, cod liver oil, carotenoid, ergosterol and tocopherol; enzymes such as lipase, elastase, urokinase, protease, β -amylase, isoamylase, glucanase and lactase; extracts such as ginseng extract, snapping turtle extract, chlorella extract, aloe extract and propolis extract;

viable microorganisms such as viruses, lactic acid bacteria and yeasts; and other biologically active substances such as royal jelly. By using the present non-reducing saccharides, relatively-low reducing saccharides containing them, and trehalose prepared from these saccharides, the aforementioned biologically active substances are arbitrarily prepared into health foods and pharmaceuticals with a satisfactorily-high stability and quality without a fear of losing or inactivating their effective ingredients and activities.

As described above, the methods to incorporate the present non-reducing saccharides, relatively-low reducing saccharides containing them and/or trehalose prepared from these saccharides into the above-mentioned compositions include conventional methods, for example, mixing, kneading, dissolving, melting, soaking, permeating, sprinkling, applying, coating, spraying, injecting, crystallizing and solidifying. These saccharides and trehalose are usually incorporated into the above-mentioned compositions in an amount of 0.1% or higher, preferably, one % or higher, d.s.b.

The following experiments explain the present invention more in detail.

Firstly, a non-reducing saccharide-forming amylase derived from a novel microorganism of *Rhizobium* sp. M-11 is explained about its production, purification and property; and secondary, a non-reducing saccharide-forming enzyme derived from a microorganism of *Arthrobacter* sp. Q36 is explained

similarly as in the microorganism of *Rhizobium* sp. M-11. Thirdly, non-reducing saccharide-forming enzymes derived from hitherto known microorganisms are explained.

Experiment 1

Production of non-reducing saccharide-forming enzyme from *Rhizobium* sp. M-11

A liquid nutrient culture medium, consisting of 2.0 w/v % maltose, 0.5 w/v % peptone, 0.1 w/v % yeast extract, 0.1 w/v % disodium hydrogenphosphate, 0.1 w/v % potassium hydrogenphosphate and water, was adjusted to pH 7.0. About 100 ml aliquots of the nutrient culture medium were placed in 500-ml Erlenmeyer flasks, autoclaved at 120°C for 20 minutes to effect sterilization, cooled, inoculated with a stock culture of *Rhizobium* sp. M-11 (FERM BP-4130), and incubated at 27°C for 24 hours under stirring conditions of 130rpm. The resultant cultures were pooled and used as a seed culture.

About 20 L of a fresh preparation of the same nutrient culture medium used in the above culture was placed in a 30-L fermentor, sterilized, cooled to 30°C, inoculated with one w/v % of the seed culture, and incubated for about 24 hours while stirring under aerobic conditions at 30°C and pH 6.0-8.0. The resultant culture had an enzyme activity of about 1.5 units/ml. A portion of the culture was centrifuged to separate cells and culture supernatant, and the cells were suspended in 50mM phosphate buffer (pH 7.0) to give the original volume of the portion, followed by assaying enzyme

activities of the cell suspension and culture supernatant to give about 0.6 units/ml and about 0.9 units/ml respectively.

Experiment 2

Purification of enzyme

An about 18 L of the culture obtained in Experiment 1 was treated with "Mini-Rabo", a supper high-pressure cell disrupting apparatus commercialized by Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan, to disrupt cells. The resultant mixture was centrifuged at 10,000rpm for 30 minutes to obtain an about 16 L supernatant. To the supernatant was added ammonium sulfate and dissolved to give a saturation degree of 0.2, and the resultant solution was allowed to stand at 4°C for one hour, and centrifuged at 10,000rpm for 30 min to obtain a supernatant.

Ammonium sulfate was dissolved in the supernatant to give a saturation degree of 0.6, and the resultant solution was centrifuged at 10,000rpm for 30 min to obtain a precipitate. The resultant precipitate was dissolved in 10mM phosphate buffer (pH 7.0), and the resultant solution was dialyzed against a fresh preparation of the same phosphate buffer for 24 hours, and centrifuged at 10,000rpm for 30 min to remove insoluble substances. Three hundred and sixty ml of the resultant dialyzed solution was divided into 2 portions which were then separately subjected to column chromatography using a column packed with 300ml of "DEAE-Toyopearl®", an ion exchanger commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan.

The objective enzyme was adsorbed on the ion

exchanger, and eluted from the column with a fresh preparation of the same phosphate buffer supplemented with salt. The resultant fractions having the objective enzyme activity were pooled, and dialyzed against a fresh preparation of the same phosphate buffer supplemented with 2M ammonium sulfate. The dialyzed solution thus obtained was centrifuged at 10,000rpm for 30 min to remove insoluble substances, and the resultant supernatant was subjected to hydrophobic column chromatography using a column packed with 300ml of "Butyl-Toyopearl® 650", a hydrophobic gel commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan. The enzyme adsorbed on the gel was eluted from the column with a linear gradient buffer from 2M to 0M, followed by recovering fractions with the enzyme activity. The resultant fractions were subjected to gel filtration chromatography using "Toyopearl® HW-55", a resin for gel chromatography commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, followed by recovering fractions with the enzyme activity. The enzyme activity, specific activity and yield in each purification step are as shown in Table 1.

Table 1

Purification step	Enzyme activity (unit)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)
Culture	26,800		100
Supernatant after cell disruption	20,300	0.10	76
Dialyzed solution after salting out with ammonium sulfate	16,100	0.32	60
Eluate from ion-exchange column	11,300	5.5	42
Eluate from hydrophobic column	5,730	98	21
Eluate from gel filtration column	3,890	195	15

A purified enzyme preparation, obtained as an eluate from gel filtration column in Table 1, was determined its purity on electrophoresis using 7.5% polyacrylamide gel to exhibit a single protein band, and this revealed that the preparation was an electrophoretically homogeneous enzyme with a relatively-high purity.

Experiment 3

Property of enzyme

The purified enzyme preparation obtained in Experiment 2 was subjected to electrophoresis using 10% sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel, and this revealed that the molecular weight was about 77,000-87,000 daltons in comparison with those of marker proteins commercialized by Japan Bio-Rad

Laboratories, Tokyo, Japan.

The purified enzyme preparation was subjected to isoelectrophoresis using polyacrylamide gel containing 2 v/v % "Ampholine" an ampholyte commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden. The resultant gel was sliced into pieces, and a gel piece containing the enzyme was determined its pH to reveal that the enzyme has a pI of about 3.6-4.6.

Effects of temperature and pH on the enzyme were studied in accordance with the assay as used for the enzyme activity. These results were respectively shown in FIG.s 1 and 2. The optimum temperature of the enzyme was about 40°C when reacted at pH 7.0 for 60 min, and the optimum pH was about 7.0 when reacted at 40°C for 60 min. The thermal stability of the enzyme was determined by incubating it in 50mM phosphate buffers (pH 7.0) at different temperatures for 60 min, cooling the buffers, and assaying the remaining enzyme activity in each buffer. The pH stability of the enzyme was determined by incubating it in 50mM phosphate buffers having different pHs at 25°C for 16 hours, adjusting the buffers to pH 7, and assaying the remaining enzyme activity in each buffer. The results of thermal stability and pH stability were respectively shown in FIG.s 3 and 4. The enzyme was stable up to a temperature of about 40°C and at a pH of about 6-9.

Experiment 4

Preparation of non-reducing saccharides

An aqueous solution containing 20% glucose, maltose,

maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose or maltoheptaose as a substrate was prepared, and mixed with 2 units per g substrate, d.s.b., of the purified enzyme preparation obtained in Experiment 2, and the resultant mixture was subjected to an enzymatic reaction at 40°C and pH 7.0 for 48 hours. The reaction mixture was desalted and analyzed on high-performance liquid chromatography (HPLC) using "Wakobeads WB-T-330 column", a product of Wako Pure Chemical Industries Ltd., Tokyo, Japan. The HPLC procedure was conducted at an ambient temperature and a flow rate of 0.5ml/min of water as an eluent, and "RI-8012", a differential refractometer commercialized by Tosho Corporation, Tokyo, Japan, was used for analyzing reaction products.

The results were as shown in Table 2.

Table 2

Substrate	Product	Elution time on HPLC (min)	Percentage (%)
Glucose	Glucose	33.4	100.0
Maltose	Maltose	28.5	100.0
Maltotriose	P I	23.3	35.0
	Maltotriose	25.9	65.0
Maltotetraose	P II	21.6	85.6
	Maltotetraose	24.1	14.4
Maltopentaose	P III	19.7	92.7
	Maltopentaose	22.6	7.3
Maltohexaose	P IV	18.7	93.5
	Maltohexaose	21.4	6.5

(Continued)

Substrate	Product	Elution time on HPLC (min)	Percentage (%)
Maltoheptaose	P V	17.8	93.4
	Maltoheptaose	21.0	6.7

Note: In the Table, the symbols "P I", "P II", "P III", "P IV" and "P V" mean novel saccharides formed from the respective substrates of maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose and maltoheptaose.

As evident from the results in Table 2, each reaction product substantially consisted of the remaining substrate and a newly-formed saccharide P I, P II, P III, P IV or P V, and other saccharides were not substantially detected. It was revealed that P II, P III, P IV and P V, which have a degree of glucose polymerization of 4 or higher, gave a high yield, i.e. a percentage of 85% or higher, d.s.b., while the yield of P I, which has a degree of glucose polymerization of 3 or higher, gave a relatively-low yield. It was revealed that no novel saccharide was formed from glucose and maltose.

In order to purify the newly-formed saccharides in each reaction mixture, they were column chromatographed on "XT-1016 (Na⁺-form, polymerization degree of 4%)", an alkaline-metal strongly-acidic action exchange resin commercialized by Tokyo Organic Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan. The resin was packed in 3 jacketed-stainless steel columns, each column having an inner diameter of 2.0cm and a length of one m, and the columns were cascaded in series, fed with a 5 v/v

% reaction mixture containing saccharides against the resin while the inner column temperature was keeping at 55°C, and eluted with 55°C hot water at a flow rate of SV (space velocity) 0.13 to obtain a high-purity saccharide fraction containing 97% or higher of a novel saccharide, d.s.b. The fraction was dried *in vacuo* to obtain a high-purity preparation of a novel saccharide. The yields of P I, P II, P III, P IV and P V were respectively about 9%, 65%, 82%, 80% and 77% with respect to their material saccharides, d.s.b. The purities of P I, P II, P III, P IV and P V were respectively about 97.5%, 98.6%, 99.5%, 98.4% and 98.4%, d.s.b.

The reducing powders of these novel saccharides were determined on the Somogyi-Nelson's method and expressed by DE (dextrose equivalent). The results were as shown in Table 3.

Table 3

Saccharide preparation	Purity (%)	DE
P I	97.5	0.83
P II	98.6	0.35
P III	99.5	0.10
P IV	98.4	0.27
P V	98.4	0.23

As evident from the results in Table 3, each saccharide preparation only showed a slight reducing power.

It was estimated that the slight reducing power was due to the remaining reducing maltooligosaccharides originated from substrates, and this led to a conclusion that the newly formed saccharides were substantially non-reducing saccharides.

Experiment 5

Maillard reaction

A solution, containing of one % glycine and 10% of a saccharide preparation P I, P II, P III, P IV or P V in Experiment 4 and 50mM phosphate buffer (pH 7.0), was kept at 100°C for 90 min, followed by cooling the resultant solution, and determining its absorbance at a wave length of 480nm in 1-cm cell. As a control, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose and maltoheptaose as a material for the saccharide preparations were similarly treated as above, and measured their absorbances at a wave length of 480nm. The results were as shown in Table 4

Table 4

Saccharide preparation	Coloration degree (480nm)	Judgement
P I	0.027	Present invention
P II	0.018	Present invention
P III	0.012	Present invention
P IV	0.016	Present invention
P V	0.015	Present invention
Maltotriose	0.623	Control

(Continued)

Saccharide preparation	Coloration degree (480nm)	Judgement
Maltotetraose	0.475	Control
Maltopentaose	0.369	Control
Maltohexaose	0.318	Control
Maltoheptaose	0.271	Control

As evident from the results in Table 4, it was revealed that the newly-formed non-reducing saccharides P I, P II, P III, P IV and P V only showed a slight coloration caused by the maillard reaction, i.e. the coloration degree was only 3-6% of those of their corresponding material maltooligosaccharides. The results revealed that the non-reducing saccharides formed by the present enzyme are substantially free from the maillard reaction.

Experiment 6

Enzymatic hydrolysis by glucoamylase

Fifty mg aliquots of non-reducing saccharides P I, P II, P III, P IV and P V in Experiment 4 were respectively dissolved in one ml of 50mM acetate buffer (pH 4.5), admixed with one unit of glucoamylase commercialized by Seikagaku-Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan, to effect enzymatic hydrolysis at 40°C for 6 hours. The only saccharides detected in every resultant mixture on HPLC analysis were glucose and trehalose. The contents of the detected glucose and trehalose, and their

molecular ratios were as shown in Tale 5.

Table 5

Saccharide preparation	Glucose (%)	Trehalose (%)	Molecular ratio (Glucose/Trehalose)
P I	36.2	63.8	1.07
P II	52.0	48.0	2.06
P III	61.4	38.6	3.02
P IV	68.3	31.7	4.09
P V	72.9	27.1	5.11

As evident from the results in Table 5, it was revealed that (i) the non-reducing saccharide P I was hydrolyzed into one mole of glucose and one mole of trehalose; P II, hydrolyzed into two moles of glucose and one mole of trehalose; (iii) P III, hydrolyzed into three moles of glucose and one mole of trehalose; (iv) P IV, hydrolyzed into four moles of glucose and one mole of trehalose; and (v) P V, hydrolyzed into five moles of glucose and one mole of trehalose.

In view of the enzymatic reaction mechanism of glucoamylase, it was revealed that these non-reducing saccharides have a structure of saccharide consisting of one or more moles of glucose bound to one mole of trehalose via the α -1,4 linkage or α -1,6 linkage: The non-reducing saccharide P I is a non-reducing saccharide having a degree of glucose

polymerization of 3 (DP 3) and consisting of one mole of glucose bound to one mole of trehalose; P II, a non-reducing saccharide having DP 4 and consisting of two moles of glucose bound to one mole of trehalose; P III, a non-reducing saccharide having DP 5 and consisting of three moles of glucose bound to one mole of trehalose; P IV, a non-reducing saccharide having DP 6 and consisting of four moles of glucose bound to one mole of trehalose; and P V, a non-reducing saccharide having DP 7 and consisting of five moles of glucose bound to one mole of trehalose. It was revealed that, when β -amylase was act on these non-reducing saccharides similarly as with glucoamylase, P I and P II were not hydrolyzed but P III, P IV and P V were respectively hydrolyzed into one mole of maltose and one mole of P I, one mole of maltose and one mole of P II, and two moles of maltose and one mole of P I.

Based on these results, it was concluded that the enzymatic reaction of the present non-reducing saccharide-forming enzyme is an intramolecular reaction without changing the molecular weights of the substrates used, i.e. an intramolecular reaction without changing their degrees of glucose polymerization. It was concluded that the non-reducing saccharides P I, P II, P III, P IV and P V were the respective α -glycosyl trehaloses of α -glucosyl trehalose, α -maltosyl trehalose, α -maltotriosyl trehalose, α -maltotetraosyl trehalose and α -maltopentaosyl trehalose.

Experiment 7

Hydrolysis by enzymes

The non-reducing saccharide P I, P II, P III, P IV or P V as a substrate in Experiment 4 was subjected to an α -amylase specimen derived from pig pancreas, an α -glucosidase specimen derived from rice or a rat intestinal acetone powder, all of which are commercialized by Sigma Chemical Company, St. Louis, USA, and each resultant hydrolysate was analyzed on HPLC to reveal its saccharide composition. The enzymatic reaction with the α -amylase was as follows: Dissolving 10mg of a substrate in one ml of 50mM phosphate buffer (pH 6.9), mixing the resultant solution with one unit of the α -amylase, and incubating the resultant mixture at 37°C for 18 hours. The enzymatic reaction with the α -glucosidase was conducted under the same conditions as in the case of α -amylase except that 50mM acetate buffer (pH 4.0) was used as a buffer. The enzymatic reaction with the rat intestinal acetone powder was carried out under the same conditions as in the case of α -amylase except that 50mM maleate buffer (pH 6.0) was used as a buffer. The saccharide compositions obtained with the α -amylase, α -glucosidase and rat intestinal acetone powder were as shown in tables 6, 7 and 8 in this order.

Table 6

Saccharide	Saccharide composition of hydrolysate (%)				
	P I	P II	G3	G2	G1
P I	97.3	0	2.3	0.4	0
P II	0	98.8	0.4	0.8	0
P III	61.0	4.8	0	33.0	1.2
P IV	47.2	3.3	40.4	7.5	1.6
P V	10.2	44.9	35.3	8.6	1.0

Note: In the table, the symbols "G3", "G2" and "G1" means maltotriose, maltose and glucose respectively.

Table 7

Saccharide	Saccharide composition of hydrolysate with α -glucosidase		
	Glucose (%)	Trehalose (%)	Other saccharides (%)
P I	36.5	63.0	0.5
P II	52.1	47.6	0.3
P III	61.7	38.1	0.2
P IV	69.5	30.2	0.3
P V	71.4	28.3	0.3

Table 8

Saccharide	Saccharide composition of hydrolysate with rat intestinal acetone powder		
	Glucose (%)	Trehalose (%)	Other saccharides (%)
P I	37.2	62.4	0.4
P II	52.5	47.1	0.4
P III	62.0	37.6	0.4
P IV	68.8	30.8	0.4
P V	73.4	26.5	0.1

As evident from the table 6, it was revealed that the saccharide preparations P I and P II were not substantially hydrolyzed by α -amylase, while the saccharide preparations P III, P IV and P V were hydrolyzed by α -amylase into lower molecular weight oligosaccharides, P I, P II, maltotriose, maltose and glucose.

As evident from the results in Tables 7 and 8, it was revealed that similarly as in Experiment 6 with glucoamylase the saccharide preparations P I, P II, P III, P IV and P V were hydrolyzed by α -glucosidase and rat intestinal acetone powder into glucose and trehalose molecules.

To the resultant hydrolysate obtained with α -glucosidase or rat intestinal acetone powder was added one unit trehalase derived from pig kidney, an enzyme preparation of Sigma Chemical Company, St., Louis, USA, and the mixture was

incubated at pH 5.7 and 37°C for 18 hours, followed by analyzing the saccharide composition of the resultant mixture on HPLC to reveal that trehalose, formed from the saccharide preparations P I, P II, P III, P IV and P V, was hydrolyzed by trehalase into glucose molecules.

These observations are summarized as below:

- (1) The present non-reducing saccharide-forming enzyme forms non-reducing saccharides having a trehalose structure when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher without changing their degrees of glucose polymerization; and
- (2) The non-reducing saccharide P V is mainly hydrolyzed by α -amylase into the non-reducing saccharide P II and maltotriose, while the non-reducing saccharide P II is hydrolyzed by glucoamylase into one mole of trehalose and two moles of glucose.

Based on these results, it was concluded that the present non-reducing saccharide-forming enzyme is a novel enzyme with a mechanism which intramolecularly converts a reducing end-group in reducing partial starch hydrolysates to a non-reducing end unit, a trehalose residue, i.e. a trehalose structure.

Experiment 8

Acute toxicity test

By using 7-week old dd-strain mice, the non-reducing

saccharide preparation P I, P II, P III, P IV or P V was orally administered to the mice for its acute toxicity test. As a result, it was revealed that these saccharide preparations are safe substances with a relatively-low toxicity, and that no mouse died even when administered with them at the highest possible doses. Though not so accurate, the values of LD₅₀ of these saccharide preparations were 50g/kg or higher.

Experiment 9

Production of non-reducing saccharide-forming enzyme from *Arthrobacter* sp. Q36

Similarly as in Experiment 1, a seed culture of *Arthrobacter* sp. Q36 (FERM BP-4316) was cultured by a fermentor for about 72 hours in place of *Rhizobium* sp. M-11 (FERM BP-4130). The enzymatic activity of a non-reducing saccharide-forming enzyme in the resultant culture was about 1.2 units/ml. Similarly as in Experiment 1, a cell suspension and a supernatant, prepared from the resultant culture, were assayed their activities to give about 0.5 units/ml and about 0.7 units/ml respectively.

Experiment 10

Purification of enzyme

By using an about 18 L of the resultant culture obtained by the method in Experiment 9, the resultant non-reducing saccharide-forming enzyme was purified similarly as in Experiment 2. The results in each purification step were tabulated in Table 9.

Table 9

Purification step	Enzyme* activity (unit)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)
Culture	21,600		100
Supernatant after cell disruption	17,500	0.14	81
Dialyzed solution after salting out with ammonium sulfate	15,700	0.41	73
Eluate from ion- exchange column	12,600	6.5	58
Eluate from hydrophobic column	8,820	98	41
Eluate from gel filtration column	5,290	201	24

Note: The symbol "*" means a non-reducing
saccharide-forming enzyme.

A purified enzyme preparation, obtained as the eluate from gel filtration column in Table 9, was studied on its purity on electrophoresis similarly as in Experiment 2 to reveal a single protein band, and this showed that the enzyme preparation was a relatively-high purity enzyme having an electrophoretically single band.

Experiment 11

Property of enzyme

The purified enzyme preparation obtained in Experiment 10 was determined its molecular weight on SDS-PAGE to give about 76,000-86,000 daltons. The pI of the enzyme preparation was determined on isoelectrophoresis similarly as

in Experiment 3 to give a pI of about 3.6-4.6. The effects of temperature and pH on the enzyme preparation, and the thermal stability and pH stability thereof were studied similarly as in Experiment 3. These results on temperature, pH, thermal stability and pH stability were respectively as shown in FIG.s 5, 6, 7 and 8.

As evident from these FIG.s, the optimum temperature of the enzyme preparation is about 40°C; the optimum pH, about 6.5-7.0; the thermal stability, up to about 40°C; and the pH stability, about 6.0-9.5.

Experiment 12

Preparation of non-reducing saccharide

By using the purified enzyme preparation obtained in Experiment 10, the preparation and the confirmation of the structure of non-reducing saccharides were experimented in accordance with the methods in Experiments 4 and 6. As a result, it was revealed that the enzyme preparation forms one or more non-reducing saccharides, which has a trehalose structure as an end unit and a degree of glucose polymerization of 3 or higher, when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher.

Experiment 13

Preparation and property of non-reducing saccharide-forming enzyme from known microorganisms

Among known microorganisms the microorganisms as listed in Table 10, which had been confirmed to produce the

present non-reducing saccharide-forming enzyme, were cultured by a fermentor at 27°C for 72 hours similarly as in Experiment 1 except that a microorganism of *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 19420) was cultured at 37°C. Eighteen L of each resultant culture was subjected to a cell disrupting apparatus, and the resultant supernatant was salted out with ammonium sulfate, dialyzed, and subjected to an ion-exchange column to obtain a partially purified enzyme preparation, followed by studying its properties. The results were tabulated in Table 10.

Table 10

Microorganism	Enzyme activity in eluate from ion-exchange column (Unit)	Optimum temperature (° C)	Optimum pH (° C)	Thermal stability	pH Stability
<i>Brevibacterium helvolum</i> (ATCC 11822)	2,700	About 35	About 6.5	Up to about 35	About 5.5-11.0
<i>Flavobacterium aquatile</i> (IFO 3772)	216	About 35	About 6.5-6.9	Up to about 35	About 6.0-9.5
<i>Micrococcus luteus</i> (IFO 3064)	1,730	About 35	About 6.4-6.8	Up to about 35	About 6.5-8.0
<i>Micrococcus roseus</i> (ATCC 186)	1,340	About 35	About 6.8-7.2	Up to about 35	About 6.0-11.0
<i>Curtobacterium citreum</i> (IFO 15231)	1,290	About 30	About 6.4-6.8	Up to about 35	About 6.5-7.8
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (ATCC 19420)	358	About 35	About 6.5	Up to about 35	About 6.0-9.0
<i>Terrabacter tumescens</i> (IFO 12960)	1,050	About 35	About 6.5-7.0	Up to about 35	About 6.0-9.5
<i>Rhizobium</i> sp. M-11	11,300	About 40	About 7.0	Up to about 40	About 6.0-9.0
<i>Arthrobacter</i> sp. Q36	12,600	About 40	About 6.5-7.0	Up to about 40	About 6.0-9.5

In accordance with the method in Experiment 12, non-reducing saccharides were prepared by using partially purified enzyme preparations from these known microorganisms, and studied on their structures to find that, similarly as the non-reducing saccharide-forming enzyme from *Rhizobium* sp. M-11, every enzyme preparation formed non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and a degree of glucose polymerization of 3 or higher when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher.

Experiment 14

Partial amino acid sequence of non-reducing saccharide-forming enzyme

Experiment 14 (1)

Amino acid sequence containing N-terminal

A part of a purified enzyme preparation derived from *Rhizobium* sp. M-11, obtained by the method in Experiment 2, and a part of a purified enzyme preparation derived from *Arthrobacter* sp. Q36, obtained by the method in Experiment 10, were dialyzed against distilled water, and about 80µg protein of each resultant preparation was used as a sample for determining their amino acid sequences containing their N-terminals. The amino acid sequences were analyzed on "Protein sequencer Model 473A", an apparatus of Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA, to reveal their 10 amino acid residues from their N-terminals. Partial amino acid sequences

containing the N-terminals of the enzyme preparations were as shown in Table 11.

Table 11

Origin	Partial amino acid sequence containing N-terminal
Rhizobium sp.M-11	valine-arginine-threonine-proline-alanine-serine-threonine-tyrosine-arginine-leucine-
Arthrobacter sp. Q36	methionine-arginine-threonine-proline-valine-serine-threonine-tyrosine-arginine-leucine-

As evident from Table 11, the partial amino acid sequence containing the N-terminal of the enzyme preparation from *Rhizobium* sp. M-11 differs from that of *Arthrobacter* sp. Q36 in that the N-terminal amino acid residue of the former is valine and that of the latter is methionine, while they have 8 common amino acid residues among the analyzed 10 amino acid residues. More particularly, they completely coincide with each other in that they have the same amino acid sequence consisting of 3 amino acid residues which are positioned between L-arginine corresponding to the second amino acid residue with respect to their N-terminals and L-proline corresponding to the forth amino acid residue with respect to their N-terminals; as well as having the same amino acid sequence consisting of 5 amino acid residues which are positioned between L-serine corresponding to the sixth amino

acid residue with respect to their N-terminals and L-leucine corresponding to the tenth amino acid residue with respect to their N-terminals. It was revealed that these enzyme preparations have a common partial amino acid sequence containing N-terminal of X₁-arginine-threonine-proline-X₂-serine-threonine-tyrosine-arginine-leucine- (wherein "X₁" means valine or methionine and "X₂" means alanine or valine).

Experiment 14 (2)

Internal partial amino acid sequence

A part of a purified enzyme preparation derived from *Rhizobium* sp. M-11, obtained by the method in Experiment 2, and a part of a purified enzyme preparation derived from *Arthrobacter* sp. Q36, obtained by the method in Experiment 10, were dialyzed against 10mM Tris-HCl buffer (pH 9.0), and the resultants were respectively diluted with a fresh preparation of the same buffer to give about one mg/ml. To one ml aliquots of the resultant solutions were added 10µg "Lysyl Endopeptidase" commercialized by Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan, and allowed to react at 30°C for 22 hours to form peptides. The resultant mixtures were subjected to reverse phase high-performance liquid chromatography (reverse phase HPLC) to separate the peptides. The apparatus and conditions used to separate the peptides of the enzyme preparation from *Rhizobium* sp. M-11 on the reverse phase HPLC were "CAPCELL PAK C18 column", a diameter of 4.6mm and a length of 250mm, a product of Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan; a flow

rate, 0.6ml/min; a temperature, an ambient temperature; an elution time, 60 min; and a gradient, a liner gradient of a solution containing 0.1 v/v % trifluoro acetate and acetonitrile ranging from 16-48 v/v %. The apparatus and conditions used to separate the peptides of the enzyme preparation from *Arthrobacter* sp. Q36 on reverse phase HPLC were "µ-Bondapak C18 column" having a diameter of 2.1mm and a length of 150mm, a product of Waters Chromatography Div., MILLIPORE Corp., Milford, USA; a flow rate, 0.9ml/min; a temperature, an ambient temperature; an elution time, 60 min; and a gradient, a liner gradient of a solution containing 0.1 v/v % trifluoro acetate and acetonitrile ranging from 30-55 v/v %. The peptides eluted from the columns were detected by monitoring an absorbency at a wavelength of 210nm. From the enzyme preparation of *Rhizobium* sp. M-11 three peptides named as R37, R40 and R42 having the respective retention times of about 37, 40 and 42, and from the enzyme preparation of *Arthrobacter* sp. Q36 three peptides named as A17, A22 and A40 having the respective retention times of about 17, 22 and 40 were recovered after separation of concomitant peptides, followed by drying the resultant peptides *in vacuo* and dissolving them in 200µl aliquot solutions with different concentrations of 0.1-50 v/v % acetonitrile. Each peptide specimen thus obtained was subjected to a protein sequencer to analyze its amino acid sequence up to 10 amino acid residues. The analyzed internal partial amino acid sequences were as

shown in Table 12.

Table 12

Origin	Peptide	Internal partial amino acid sequence
<i>Rhizobium</i> sp. M-11	R37	glycine-valine-glutamic acid-Aspartic acid-threonine-alanine-phenylalanine- phenylalanine-arginine-tyrosine-
	R40	leucine-valine-glutamine-leucine- threonine-methionine-proline-glycine- valine-proline-
	R42	glutamic acid-glycine-arginine- glycine-serine-proline-tyrosine- alanine-valine-alanine-
<i>Arthrobacter</i> sp. Q36	A17	glycine-valine-glutamic acid- aspartic acid-threonine-alanine-phenyl alanine-phenylalanine-arginine- tyrosine-
	A22	leucine-valine-glutamine-leucine- threonine-methionine-proline-glycine- valine-proline-
	A40	glutamic acid-glycine-arginine- glutamine-serine-arginine-tyrosine- alanine-glutamic acid-alanine-

As evident from Table 12, the partial amino acid sequence of peptide R37 of the enzyme preparation from *Rhizobium* sp. M-11 completely coincided with that of peptide R40, while that of peptide R40 completely coincided with that of peptide A22. As regards peptides R42 and A40, they have 7 common amino acid residues among the analyzed 10 amino acid residues; i.e. peptides R42 and A40 have a common partial amino

acid sequence of glutamic acid-glycine-arginine-X₃-serine-X₄-tyrosine-alanine-X₅-alanine- (wherein "X₃" means glycine or glutamine; "X₄", proline or arginine; and "X₅", valine or glutamic acid).

The following Examples A illustrate the preparation of the present non-reducing saccharides, relatively-low reducing saccharides containing them, and trehalose; and Examples B illustrate compositions containing one or more of these saccharides and trehalose.

Example A-1

A seed culture of *Rhizobium* sp. M-11 (FERM BP-4130) was inoculated in a nutrient culture medium and incubated by a fermentor for about 36 hours in accordance with the method in Experiment 1. After completion of the incubation, the resultant culture was filtered to remove cells with an SF-membrane to obtain an about 18 L filtrate which was then concentrated with a UF-membrane to obtain about one L of a concentrated solution containing 17.7 units/ml of the present non-reducing saccharide-forming enzyme.

Six % suspension of potato starch, d.s.b., was gelatinized by heating, adjusted to pH 4.5 and 50°C, mixed with 2,500 units per g starch of isoamylase commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japan, and subjected to an enzymatic reaction for 20 hours. The resultant mixture was adjusted to pH 6.0, autoclaved at 120°C for 10 min, cooled to 45°C, admixed with 150 units per g starch of "Termamyl 60L", α -amylase commercialized by Novo Industri A/S,

Copenhagen, Denmark, and subjected to an enzymatic reaction for 24 hours.

The reaction mixture was autoclaved at 120°C for 20 min, cooled to 45°C, admixed with one unit per g starch of the above non-reducing saccharide-forming enzyme, and subjected to an enzymatic reaction for 96 hours. The resultant mixture was kept at 95°C for 10 min, cooled and filtered. The resultant filtrate was in the usual manner decolorized with an activated charcoal, and purified by desalting it with ion-exchange resins in H- and OH-form. The resultant solution was concentrated into a 70% syrup in a yield of about 91%, d.s.b.

The product exhibits a DE 18.8, and contains 8.3% P I, 5.5% P II, 37.7% P III, 1.4% P IV and 1.3% P V, d.s.b. The product has a mild and high-quality sweetness, as well as an adequate viscosity and moisture-retaining ability, and these render it arbitrary useful in food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer and filler.

Example A-2

A saccharide solution as a feed solution, obtained by the method in Example A-1, was fractionated by using a column packed with "XT-1016 (Na⁺-form, polymerization degree of 4%)", an alkaline metal strongly-acidic cation exchange resin commercialized by Tokyo Organic Chemical Industries Ltd., Tokyo, Japan. The procedure was as follows: The resin was packed in 4 jacketed-stainless steel columns having an inner diameter of 5.4cm, and the columns were cascaded in series to

give a total gel-bed depth of 20m. The columns were heated to give the inner column temperature of 55°C, and fed with 5 v/v % of the saccharide solution while keeping at the temperature, and the saccharide solution was fractionated by feeding to the columns with 55°C hot water to remove fractions rich in glucose and maltose, followed by recovering fractions rich in non-reducing saccharides. The fractions rich in non-reducing saccharides were pooled, purified, concentrated, dried in vacuo, and pulverized to obtain a powdery product containing non-reducing saccharides in a yield of about 61%, d.s.b.

The product exhibits a DE 5.7 and contains 9.3% P I, 7.4% P II, 55.5% P III, 2.1% P IV and 1.9% P V, d.s.b. Similarly as the product in Example A-1, the product has a mild and high-quality sweetness, as well as an adequate viscosity and moisture-retaining ability, and these render it arbitrary useful in food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer and filler.

Example A-3

Thirty-three % suspension of corn starch, d.s.b., was mixed with calcium carbonate to give the final concentration of 0.1 %, d.s.b., and the resultant mixture was adjusted to pH 6.5, admixed with 0.2%, d.s.b., per g starch of "Termamyl 60 L", α -amylase commercialized by Novo Industri A/S Copenhagen Denmark, and subjected to an enzymatic reaction at 95°C for 15 min. The reaction mixture was autoclaved at 120°C for 10 min,

cooled to 55°C, admixed with 5 units per g starch of maltotetraose-forming amylase commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japan, and subjected to an enzymatic reaction for 6 hours. The resultant mixture was admixed with 30 units per g starch of "α-amylase 2A", α-amylase commercialized by Ueda Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan, and subjected to an enzymatic reaction at 65°C for 4 hours. The reaction mixture was autoclaved at 120°C for 10 min, cooled to 45°C, admixed with 2 units per g starch of a non-reducing saccharide-forming enzyme obtained by the method in Example A-1, and subjected to an enzymatic reaction for 64 hours. The resultant mixture was kept at 95°C for 10 min, cooled and filtered to obtain a filtrate which was then decolorized with an activated charcoal in the usual manner, and purified by desalting it with ion-exchange resins in H- and OH-form, followed by concentrating the resultant solution to obtain a 70% syrup in a yield of about 90%, d.s.b.

The product exhibits a DE 10.5 and contains 3.7% P I, 43.7% P II, 1.2% P III, 1.1% P IV and 0.6% P V, d.s.b. The product has a mild and high-quality sweetness, as well as an adequate viscosity and moisture-retaining ability, and these render it arbitrary useful in food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer and filler.

Example A-4

A saccharide solution as a feed solution, obtained by the method in Example A-3, was column chromatographed in

accordance with the method in Example A-2 except that "50W-X4 (Mg⁺⁺-form)", a strongly-acidic cation exchange resin commercialized by Dow Chemical Co., Midland, Michigan, USA, was used as a resin for fractionation in order to increase the content of non-reducing saccharide P II (DP 4) and to obtain a non-reducing saccharide P II-rich fraction. The fraction was purified, concentrated and spray dried to obtain a powdery product rich in non-reducing saccharides in a yield of about 40%, d.s.b.

The product contains 8.5% P I, 68.0% P II and 1.4% P III, d.s.b., as a non-reducing saccharide, and exhibits a DE 3.5 and a substantially non or low reducing power. Similarly as the product in Example A-3, the product has a mild and high-quality sweetness, as well as an adequate viscosity and moisture-retaining ability, and these render it arbitrary useful in food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer and filler.

Example A-5

To 20% aqueous solution of maltopentaose, commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japan, was added 1.0 unit per g maltopentaose of a non-reducing saccharide-forming enzyme prepared by the method in Example A-1, and subjected to an enzymatic reaction at 45°C for 48 hours. The enzymatic reaction resulted in a conversion of about 93%, d.s.b., maltopentaose into non-reducing saccharide P III. The reaction mixture was kept at 95°C for

10 min, cooled and filtered to obtain a filtrate which was then in the usual manner decolored with an activated charcoal, desalted with ion-exchange resins in H- and OH-form, and concentrated. In order to increase the content of non-reducing saccharide P III (DP 5), the resultant concentrate was similarly as in Example A-2 column chromatographed by using an alkaline metal strongly-acidic cation exchange resin to obtain a P III-rich fraction. The fraction was purified, concentrated and spray dried to obtain a powdery product containing high-purity non-reducing saccharides in a yield of about 55%, d.s.b.

The product contained 99.0% P III as a non-reducing saccharide, d.s.b., and exhibited a DE of lower than about 0.2, the level of which is extremely low. The product has a slight sweetness and can be arbitrary used in food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent and stabilizer.

Example A-6

Forty parts by weight of "PINE-DEX #4", a partial starch hydrolysate commercialized by Matsutani Chemical Ind., Tokyo, Japan, was dissolved in 60 parts by weight of water, and the resultant solution was heated to 45°C, adjusted to pH 6.5, mixed with one unit per g partial starch hydrolysate of a non-reducing saccharide-forming enzyme prepared by the method in Example A-1, and subjected to an enzymatic reaction for 96 hours while keeping at the temperature and pH. Thereafter, the reaction mixture was heated at 100°C for 10 min to inactivated the remaining enzyme, diluted to give a concentration of about

20%, d.s.b., admixed with 10 units per g partial starch hydrolysate of "GLUCOZYME", glucoamylase commercialized by Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan, and subjected to an enzymatic reaction for 40 hours, followed by heating the resultant mixture to inactivate the remaining enzyme. The mixture thus obtained was in the usual manner decolored with an activated charcoal, desalted with an ion-exchange resin, and concentrated to give a concentration of about 60%, d.s.b.

The saccharide solution thus obtained contained 29.5% trehalose, d.s.b. The saccharide solution was column chromatographed in accordance with the method in Example A-2 except that "CG 6000 (Na⁺-form)", a strongly-acidic cation exchange resin commercialized by Japan Organo Co., Ltd., Tokyo, Japan, was used as a resin for fractionation, followed by recovering a trehalose-rich fraction. The fraction contained about 90% trehalose, d.s.b. The fraction was concentrated into an about 75% solution which was then placed in a crystallizer, admixed with about 2%, d.s.b., hydrous crystalline trehalose as a seed crystal and gradually cooled to obtain a massecuite with a degree of crystallization of about 45%. The massecuite was sprayed from a nozzle equipped on the top of a spraying tower at a pressure of 150kg/cm². In the spraying step, the massecuite was simultaneously ventilated with 85° C hot air sent from the top of the spraying tower, and the resultant crystalline powder was collected on a metal wire netting conveyer provided on the basement of the spraying tower, and gradually moved out of the tower while a stream of 40° C air was

passing upwards through the metal wire netting. The resultant crystalline powder was injected in an ageing tower and aged for 10 hours to complete the crystallization and drying, followed by recovering a powdery hydrous crystalline trehalose.

The product exhibits no substantial hygroscopicity and has a satisfiable handleability, and these render it arbitrary useful in food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer and filler.

Example A-7

One part by weight of potato starch was admixed by stirring with 6 parts by weight of water containing 0.01% per g starch of "NEO-SPITASE", α -amylase commercialized by Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan, and the resultant suspension was adjusted to pH 6.0, heated to 85-90°C, and simultaneously gelatinized and liquefied at the temperature. Thereafter, the resultant was immediately heated to 120°C for 5 min to keep the DE (dextrose equivalent) below 1.0, rapidly cooled to 55°C, adjusted to pH 7.0, admixed with 150 units per g starch of "PULLULANASE (EC 3.2.1.41)", an enzyme specimen commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, and 8 units per g starch of a maltotetraose forming enzyme described in Example A-3, and subjected to an enzymatic reaction at pH 7.0 and 50°C for 36 hours.

The reaction mixture was autoclaved at 120°C for 10 min, cooled to 45°C, admixed with 2 units per g starch of a non-reducing saccharide-forming enzyme derived from

Brevibacterium helovolum ATCC 11822 prepared by the method in Experiment 13, and subjected to an enzymatic reaction for 64 hours. The reaction mixture was heated at 95°C for 10 min, cooled and filtered. The resultant filtrate was in the usual manner decolorized with an activated charcoal, desalted and purified with ion-exchange resins of H- and OH-form. The resultant solution was concentrated and spray dried to obtain a powdery non-reducing saccharides in a yield of about 90%, d.s.b.

The product exhibits a DE 11.2, contains 2.9% P I, 61.5% P II and 0.8% P III, d.s.b., and has a mild and high-quality sweetness, as well as a satisfiable viscosity and moisture-retaining ability, and these render it arbitrary useful in compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent and stabilizer.

Example A-8

A seed culture of a microorganism of *Arthrobacter* sp. Q36 (FERM BP-4316) was inoculated in a nutrient culture medium and cultured with a fermentor for about 72 hours in accordance with the method in Experiment 9. The resultant culture was centrifuged to remove cells, and the resultant supernatant was concentrated by about 10 times with a UF-membrane to obtain an enzyme solution containing about 15.2 units/ml of the present non-reducing saccharide-forming enzyme.

In accordance with the method in Example A-3, 30%

suspension of corn starch was subjected to the action of an α -amylase specimen commercialized by Novo Industri A/S, Copenhagen, Denmark; a maltotetraose forming amylase specimen commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan; and an α -amylase specimen commercialized by Ueda Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan. The resultant mixture was autoclaved at 120°C, cooled to 45°C, admixed with 2 units per g starch of a non-reducing saccharide-forming enzyme prepared by the above-mentioned method, and subjected to an enzymatic reaction for 64 hours. The reaction mixture was heated at 100°C for 10 min to inactivate the remaining enzyme. In accordance with the method in Example A-6, the resultant solution was subjected to the action of glucoamylase commercialized by Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan, decolorized, desalted and concentrated into an about 60% solution. The saccharide solution thus obtained contained about 25% trehalose, d.s.b. The saccharide solution was fractionated on column chromatography using a strongly-acidic cation-exchange resin to obtain fractions rich in trehalose. The fractions were pooled, placed in a vessel and boiled down under a reduced pressure into a syrup with a moisture content of about 4.0%. The syrup was placed in a crystallizer and admixed with one % of anhydrous crystalline trehalose, as a seed crystal, with respect to the syrup, d.s.b., followed by crystallizing anhydrous crystalline trehalose at 95°C for 5 min while stirring. The resultant was transferred to an aluminum container and aged at 100°C for 6 hours to form a block. The

resultant block was pulverized by a cutting machine and subjected to a fluidized-bed drying to obtain a powdery anhydrous crystalline trehalose with a moisture content of about 0.3%.

The product can be arbitrary used in hydrous matters such as food products, cosmetics and pharmaceuticals, and their materials and intermediates as a desiccant, as well as a white powdery sweetener with a high-quality and mild sweetness.

Example B-1

Sweetener

To one part by weight of a powdery product rich in non-reducing saccharides, obtained by the method in Example A-4, was homogeneously added 0.01 part by weight of "αG Sweet", α-glycosyl stevioside commercialized by Toyo Sugar Refining Co., Ltd., Tokyo, Japan, and 0.01 part by weight of L-aspartyl-L-phenylalanine methylester commercialized by Ajinomoto Co., Ltd., and the mixture was fed to a granulator to obtain a granular sweetener. The product has a satisfiable sweetness and a 2-fold higher sweetening power of sucrose, and the caloric value is lowered to about 1/2 of that of sucrose.

The product having a satisfiable stability neither affects nor decomposes other sweeteners with a relatively-high sweetness when mixed with them, and because of this it can be suitably used as a low-caloric sweetener for low-caloric food products for fat persons and diabetics who are restricted to a reduced calorie intake.

The product scarcely forms acid and insoluble glucans

when dental carries-inducing microorganisms act on it, and this renders it useful for sweetening food products directed to the prevention of dental carries.

Example B-2

Hard candy

One hundred parts by weight of 55% sucrose solution was mixed with 30 parts by weight of a syrup containing non-reducing saccharides, obtained by the method in Example A-3, and the resultant mixture was concentrated by heating *in vacuo* until the moisture content lowered to below 2%. The concentrated solution was admixed with one part by weight of citric acid and adequate amounts of a lemon flavor and a coloring agent, and the resultant mixture was formed in the usual manner to obtain the desired product.

The product is a high-quality hard candy having a satisfiable taste and biting property, as well as having no fear of changing the form and causing crystallization of sucrose.

Example B-3

Chewing gum

Three parts by weight of gum base was melted by heating until it softened, and the resultant was mixed with 4 parts by weight of sucrose and 3 parts by weight of a hydrous crystalline trehalose powder obtained by the method in Example A-6, and further mixed with adequate amounts of a flavor and a coloring agent. The resultant mixture was kneaded by a roll in the usual manner, formed and packed to obtain the desired

product.

The product is a chewing gum having a satisfiable texture and taste.

Example B-4

Sweetened condensed milk

Three parts by weight of a syrup containing non-reducing saccharides obtained by the method in Example A-1 and one part by weight of sucrose were dissolved in 100 parts by weight of fresh milk, and the resultant solution was sterilized by heating with a plate heater, and condensed into a 70% solution, followed by aseptically canning the resultant into the desired product.

The product with a mild sweetness and a satisfiable taste can be arbitrary used as a seasoning for baby foods, fruit, coffee, cocoa and tea.

Example B-5

Beverage containing lactic acid bacteria

One hundred and seventy-five parts by weight of defatted milk, 80 parts by weight of a high non-reducing saccharide content powder prepared by the method in Example A-2, and 50 parts by weight of a high lactosucrose content powder disclosed in Japanese Patent Laid-Open No.281,795/92 were dissolved in 1,200 parts by weight of water, and the resultant solution was sterilized by heating at 65°C for 30 min, cooled to 40°C, admixed in the usual manner with 30 parts by weight of lactic acid bacteria as a starter, and incubated at 37°C for 8 hours to obtain a beverage containing lactic acid bacteria.

The product is a beverage containing lactic acid bacteria with a satisfiable taste and flavor. The product containing oligosaccharides stably retains lactic acid bacteria and promotes the growth of bifid bacteria.

Example B-6

Powdered juice

Thirty-three parts by weight of a powdered orange juice prepared by spray drying was mixed to homogeneity under stirring conditions with 50 parts by weight of a powder rich in non-reducing saccharides obtained by the method in Example A-2, 10 parts by weight of sucrose, 0.65 parts by weight of anhydrous citric acid, 0.1 part by weight of malic acid, 0.1 part by weight of L-ascorbic acid, 0.1 part by weight of sodium citrate, 0.5 parts by weight of pullulan, and an adequate amount of a powdered flavor. The resultant mixture was pulverized, fed to a fluidized-bed granulator and granulated for 30 min by spraying it with a syrup containing non-reducing saccharides as a binder obtained by the method in Example 1 while sending to the contents 40°C air at a flow rate of 150m³. The granules thus obtained were weighed and packaged to obtain the desired product.

The product contains 30% orange juice, d.s.b. The product was stable for a relatively-long period of time without giving an unsatisfiable taste and smell.

Example B-7

Custard cream

One hundred parts by weight of corn starch, 100 parts

by weight of a syrup containing non-reducing saccharides obtained by the method in Example A-3, 80 parts by weight of maltose, 20 parts by weight of sucrose, and one part by weight of salt were mixed to homogeneity. The resultant mixture was admixed with 280 parts by weight of egg, and gradually added with 1,000 parts by weight of a boiling milk. The mixture thus obtained was continued stirring while heating, and the heating was stopped when the corn starch in the mixture was completely gelatinized to give the whole contents semitransparent, followed by cooling the resultant and adding thereto an adequate amount of a vanilla flavor. The resultant mixture was weighed, injected and packaged to obtain the desired product.

The product has a smooth surface and gloss, as well as a mild taste and sweetness.

Example B-8

An (beans paste)

Ten parts by weight of *adzuki* beans as a material was boiled by the addition of water in the usual manner, followed by removing the astringency and harshness of the beans, as well as water-soluble impurities, to obtain about 21kg "*adzuki-tsubu-an*". To the resultant was added 14 parts by weight of sucrose, 5 parts by weight of a syrup containing non-reducing saccharides obtained by the method in Example A-3, and 4 parts by weight of water, and the resultant mixture was boiled, mixed with a small amount of salad oil, and carefully kneaded up so as not to paste the beans. Thus, the desired product was

obtained in a yield of about 35kg.

The product free from discoloration induced by boiling has a satisfiable taste and flavor, and these render it useful as a material an for bean-jam buns, buns with bean-jam filling, dumplings, bean-jam-filled wafers, sherbets and ice creams.

Example B-9

Bread

One hundred parts by weight of wheat powder, 2 parts by weight of yeast, 5 parts by weight of sugar, one part by weight of a powder containing non-reducing saccharides obtained by the method in Example A-7, 0.1 part by weight of inorganic yeast food were kneaded with water in the usual manner to effect fermentation at 26°C for 2 hours, and further aged for 30 min, followed by baking up the resultant.

The product is a high-quality bread having a satisfiable hue and rising, as well as a satisfiable elasticity and mild sweetness.

Example B-10

Ham

To one thousand parts by weight of ham meat slices was added and ground to homogeneity 15 parts by weight of salt and 3 parts by weight of potassium nitrate, and the resultant slices were piled up and allowed to stand overnight in a cold-storage room. Thereafter, the resultant slices were first soaked for 7 days in a cold-storage room in a salt solution consisting of 500 parts by weight of water, 100 parts by weight

of salt, 3 parts by weight potassium nitrate, 40 parts by weight of a powder containing non-reducing saccharides prepared by the method in Example A-7, and an adequate amount of a peppermint, then washed with cold water in the usual manner, tied up, smoked, cooked, cooled and packaged to obtain the desired product.

The product is a high-quality ham having a satisfiable hue, taste and flavor.

Example B-11

Powdery peptide

Forty % "Hinute S", a peptide solution of edible soy beans commercialized by Fuji Oil Co., Ltd., Tokyo, Japan, was mixed with 2 parts by weight of a powder containing hydrous crystalline trehalose prepared by the method in Example A-6, and the resultant mixture was placed in a plastic vessel, dried *in vacuo* at 50°C, and pulverized to obtain a powdery peptide.

The product having a satisfiable taste and flavor can be arbitrary used as a material for confectioneries such as premixes, sherbets and ice creams, as well as baby foods and therapeutic nutrition in the form of oral and intubation feedings.

Example B-12

Powdery egg yolk

Egg yolks prepared from fresh eggs were sterilized at 60-64°C by a plate heater, and the resultant liquid was mixed with 4 parts by weight of a powdery anhydrous crystalline trehalose prepared by the method in Example A-8 with respect

to one part by weight of the liquid. The resultant mixture was transferred to a vessel, allowed to stand overnight to form a block while the anhydrous crystalline trehalose was allowing to convert into hydrous crystalline trehalose. The block thus obtained was pulverized by a cutting machine to obtain a powdery egg yolk.

The product can be arbitrary used as a material for confectioneries for premixes, sherbets, ice creams and emulsifiers, as well as baby foods and therapeutic nutrition in the form of oral and intubation feedings. The product can be also used as a skin refiner and hair restorer.

Example B-13

Cosmetic cream

Two parts by weight of polyoxyethylene glycol monostearate, 5 parts by weight of glyceryl monostearate, self-emulsifying, 2 parts by weight of a powder rich in non-reducing saccharides obtained by the method in Example A-2, one part by weight of α -glycosyl rutin, one part by weight of liquid petrolatum, 10 parts by weight of glyceryl tri-2-ethylhexanoate, and an adequate amount of an antiseptic were dissolved by heating in the usual manner. The resultant solution was admixed with 2 parts by weight of L-lactic acid, 5 parts by weight of 1,3-butylene glycol and 66 parts by weight of refined water, and the resultant mixture was emulsified by a homogenizer and admixed with an adequate amount of a flavor while stirring to obtain a cosmetic cream.

The product exhibits an antioxidant activity and has

a relatively-high stability, and these render it arbitrary useful as a high-quality sunscreen, skin-refining agent and skin-whitening agent.

Example B-14

Solid pharmaceutical

To a column of an immobilized anti-human interferon- α antibody was fed in the usual manner a natural human interferon- α preparation, commercialized by Cosmo Bio, Tokyo, Japan, to adsorb the interferon- α , and fed with a buffer containing calf serum albumin as a stabilizer, followed by removing an excessive amount of the albumin. Thereafter, the interferon- α was eluted with a physiological saline containing 5% of a high-purity non-reducing saccharides, d.s.b., obtained by the method in Example A-5, while varying the pH of the physiological saline.

The resultant eluate was membrane filtered, and the filtrate was dehydrated by about 20-fold volumes of "FINETOSE®", an anhydrous crystalline maltose powder commercialized by Hayashibara Shoji Inc., Okayama, Japan, followed by pulverizing the resultant dehydrated product, and tableting the resultant by a tableting machine into tablets containing about 150 units of the natural human interferon- α per one tablet, 200mg weight.

The product can be orally administered as a sublingual tablet to patients at a dose of 1-10 tablets/adult/day, and arbitrary used to treat viral diseases,

allergys, rheumatisms, diabetes and malignant tumors. More particularly, the product can be suitably used as a therapeutic agent for AIDS and hepatitis, the number of patients of which has been remarkably increased. The present non-reducing saccharides and anhydrous crystalline maltose incorporated in the product act as a stabilizer for the natural human interferon- α , so that the activity is well retained for a relatively-long period of time even at an ambient temperature.

Example B-15

Sugar coated tablet

A crude tablet as a core, 150mg weight, was coated with a solution consisting of 40 parts by weight of a powdery hydrous crystalline trehalose obtained by the method in Example A-6, 2 parts by weight of pullulan having an average molecular weight of 200,000, 30 parts by weight of water, 25 parts by weight of talc, and 3 parts by weight of titanium oxide until the total weight reached to about 230mg, and the resultant was further coated with a solution consisting of 65 parts by weight of a fresh preparation of the same powdery hydrous crystalline trehalose, one part by weight of pullulan, and 34 parts by weight of water, and glossed with a liquid wax to obtain a sugar coated tablet having a satisfiable gloss and appearance.

The product has a relatively-high shock tolerance and retains its high quality for a relatively-long period of time.
[Effect of the invention]

As evident from above, the present novel non-reducing saccharide-forming enzyme converts reducing partial starch

hydrolysates into non-reducing saccharides in a satisfactorily-high yield under a relatively-mild enzymatic reaction condition without changing the degrees of glucose polymerization of the reducing partial starch hydrolysates. The non-reducing saccharides, which can be readily separated and purified, and relatively-low reducing saccharides containing them, as well as trehalose prepared from these saccharides, have a satisfiable stability, quality and mild sweetness. These products are assimilated and utilized as an energy source by the body when orally administered. These non-reducing saccharides, relatively-low reducing saccharides containing them, and trehalose prepared from these saccharides can be arbitrary used in compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer and filler.

Thus, the present invention provides a novel technique to prepare in an industrial-scale and at a relatively-low cost non-reducing saccharides, which could not have been readily obtained in spite of their great demands, by using reducing partial starch hydrolysates prepared from starch as a cheap and abundant source, as well as to prepare relatively-low reducing saccharides containing the non-reducing saccharides, and trehalose prepared from these saccharides. The present invention has a great influence on the fields such as starch-, enzyme- and biochemical-sciences; and other industrial fields, especially, food-, cosmetic- and pharmaceutical-industries, as well as forestry, fisheries, and

agricultural-, livestock- and chemical-industries. Thus, the influence of the present invention on these fields is unfathomable.

Brief Explanation of the Accompanying Drawings

FIG.1 shows the influence of temperature on the activity of non-reducing saccharide-forming enzyme derived from *Rhizobium* sp. M-11.

FIG.2 shows the influence of pH on the activity of non-reducing saccharide-forming enzyme derived from *Rhizobium* sp. M-11..

FIG.3 shows the thermal stability of non-reducing saccharide-forming enzyme derived from *Rhizobium* sp. M-11.

FIG.4 shows the pH stability of non-reducing saccharide-forming enzyme derived from *Rhizobium* sp. M-11.

FIG.5 shows the influence of temperature on the activity of non-reducing saccharide-forming enzyme derived from *Arthrobacter* sp. Q36.

FIG.6 shows the influence of pH on the activity of non-reducing saccharide-forming enzyme derived from *Arthrobacter* sp. Q36.

FIG.7 shows the thermal stability of non-reducing saccharide-forming enzyme derived from *Arthrobacter* sp. Q36.

FIG.8 shows the pH stability of non-reducing saccharide-forming enzyme derived from *Arthrobacter* sp. Q36.

[Document name] Abstract

[Summary]

[Object] The object of the present invention is to establish a preparation of non-reducing saccharides from reducing partial starch hydrolysates, and to explore the uses thereof.

[Construction] The present invention is constructed by (i) a novel non-reducing saccharide-forming enzyme which forms non-reducing saccharides having a trehalose structure when allowed to act on one or more reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, (ii) a preparation of the enzyme, (iii) microorganisms which produce the enzyme, (iv) non-reducing saccharides having a degree of glucose polymerization of 3 or higher and a trehalose structure in their end unit, (v) relatively-low reducing saccharides containing the non-reducing saccharides, (vi) trehalose prepared from these saccharides, and (vii) compositions containing one or more of these saccharides and trehalose.

[Selected figure] None

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 7 - 1 4 3 8 7 6

(43) 公開日 平成 7 年 (1995) 6 月 6 日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 9/24		8827-4B		
A23L 1/236	A			
C07H 3/04				
3/06				
C08B 37/00	G	7433-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 21 F D (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平 5 - 3 4 9 2 1 6

(22) 出願日 平成 5 年 (1993) 12 月 28 日

(31) 優先権主張番号 特願平 4 - 3 6 2 1 3 1

(32) 優先日 平 4 (1992) 12 月 28 日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平 5 - 2 6 5 4 1 6

(32) 優先日 平 5 (1993) 9 月 30 日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000155908
株式会社林原生物化学研究所
岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号

(72) 発明者 丸田 和彦
岡山県岡山市桑野 5 2 5 番 3 - 2 1 4 号

(72) 発明者 久保田 倫夫
大阪府茨木市主原町 1 2 番 6 号

(72) 発明者 杉本 利行
岡山県岡山市東畦 6 9 5 番 4 4 号

(72) 発明者 三宅 俊雄
岡山県岡山市伊島町 1 丁目 3 番 2 3 号

(54) 【発明の名称】 非還元性糖質生成酵素とその製造方法並びに用途

(57) 【要約】

【目的】 澱粉部分分解物から非還元性糖質の製造方法の確立とその用途開発を目的とする。

【構成】 本発明は、グルコース重合度が 3 以上から選ばれる 1 種または 2 種以上の還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する新規非還元性糖質生成酵素とその製造方法、それを産生する微生物、加えて、この新規非還元性糖質生成酵素を用いて製造される末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、これを含有する低還元性糖質、およびこれらから製造されるトレハロース、並びにこれら非還元性糖質を含有せしめた組成物を主な構成とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素。

【請求項2】還元性澱粉部分分解物が、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物であり、非還元性糖質が、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質であることを特徴とする請求項1記載の非還元性糖質生成酵素。

【請求項3】非還元性糖質生成酵素が、微生物由来の酵素であることを特徴とする請求項1または請求項2記載の非還元性糖質生成酵素。

【請求項4】微生物が、リゾビウム属、アルスロバクター属、ブレビバクテリウム属、フラボバクテリウム属、マイクロコッカス属、クルトバクテリウム属、マイコバクテリウム属およびテラバクター属から選ばれる微生物である請求項3記載の非還元性糖質生成酵素。

【請求項5】下記の理化学的性質を有する非還元性糖質生成酵素。

(1) 作用

グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約76,000乃至87,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.6乃至4.6。

(4) 至適温度

pH7.0、60分間反応で、35乃至40℃付近。

(5) 至適pH

40℃、60分間反応で、pH約6.4乃至7.2。

(6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、35乃至40℃付近まで安定。

(7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.5乃至11.0。

【請求項6】グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する作用を有し、部分アミノ酸配列として、

(1) X_1 -アルギニン-トレオニン-プロリン- X_2 -セリン-トレオニン-チロシン-アルギニン-ロイシン-（但し、 X_1 はバリンまたはメチオニンを意味し、 X_2 はアラニンまたはバリンを意味する。）

(2) グリシン-バリン-グルタミン酸-アスパラギン酸-トレオニン-アラニン-フェニルアラニン-フェニルアラニン-アルギニン-チロシン-

(3) ロイシン-バリン-グルタミン-ロイシン-ト

レオニン-メチオニン-プロリン-グリシン-バリン-プロリン-

(4) グルタミン酸-グリシン-アルギニン- X_3 -セリン- X_4 -チロシン-アラニン- X_5 -アラニン-（但し、 X_3 はグリシンまたはグルタミンを意味し、 X_4 はプロリンまたはアルギニンを意味し、 X_5 はバリンまたはグルタミン酸を意味する。）

から選ばれる1種または2種以上の部分アミノ酸配列を有する非還元性糖質生成酵素。

10 【請求項7】還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物を栄養培地に培養して、得られる培養物から該非還元性糖質生成酵素を採取することを特徴とする還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素の製造方法。

20 【請求項8】微生物が、リゾビウム属、アルスロバクター属、ブレビバクテリウム属、フラボバクテリウム属、マイクロコッカス属、クルトバクテリウム属、マイコバクテリウム属およびテラバクター属から選ばれる微生物である請求項7記載の非還元性糖質生成酵素の製造方法。

30 【請求項9】グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物を栄養培地に培養して、得られる培養物から該非還元性糖質生成酵素を採取することを特徴とするグルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素の製造方法。

【請求項10】リゾビウム・スピーシーズ(Rhizobium sp.) M-11(工業技術院微生物工業技術研究所、受託番号FERM BP-4130)、または、アルスロバクター・スピーシーズ(Arthrobacter sp.) Q36(工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号FERMBP-4316)からなる非還元性糖質生成酵素産生能を有する微生物。

40 【請求項11】グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、グルコース重合度3以上の1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を作用させることを特徴とする還元性澱粉部分分解物の還元力を低減させる方法。

50 【請求項12】グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質

生成酵素を作用させ、得られる末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、またはこれを含む低還元性糖質。

【請求項13】 澱粉を部分的に加水分解して得られるグルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を作用させ、得られる末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、またはこれを含む低還元性糖質。

【請求項14】 グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質生成酵素を生成する非還元性糖質生成酵素を作用させ、末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質および夾雑糖質含有溶液とし、これを強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけ、得られる含量を向上させた末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質。

【請求項15】 グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を作用させ、得られる末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質またはこれを含む低還元性糖質を含有せしめた組成物。

【請求項16】 組成物が、飲食物、化粧品または医薬品である請求項15記載の組成物。

【請求項17】 グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を作用させ、次いでグルコアミラーゼ、または α -グルコシダーゼを作用させ、得られるトレハロース。

【請求項18】 トレハロースが含水結晶、または無水結晶である請求項17記載のトレハロース。

【請求項19】 グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質生成酵素を作用させ、次いでグルコアミラーゼ、または α -グルコシダーゼを作用させ、トレハロースおよび夾雑糖類含有溶液とし、これを強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけ、得られる含量を向上させたトレハロース。

ス。

【請求項20】 グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物を含有する溶液に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を作用させ、次いでグルコアミラーゼまたは α -グルコシダーゼを作用させ、得られるトレハロースを含有せしめた組成物。

【請求項21】 組成物が、飲食物、化粧品または医薬品である請求項20記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、非還元性糖質生成酵素とその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する新規非還元性糖質生成酵素とその製造方法、それを産生する微生物、加えて、この新規非還元性糖質生成酵素を用いて製造される末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質、これを含む低還元性糖質、および、これらから製造されるトレハロース、並びにこれら非還元性糖質を含有せしめた組成物に関する。

【0002】

【従来技術】グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、古くからトレハロース(α 、 α -トレハロース)が知られており、その存在は、『アドバンシズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー(Advances in Carbohydrate Chemistry)、第18巻、第201乃至225頁(1963年)アカデミック・プレス社(米国)および『アプライド・アンド・エンビロメンタル・マイクロバイオロジー(Applied and Environmental Microbiology)、第56巻、第3213乃至3215頁(1990年)などにも記載されているように、少量ながら、微生物、きのこ、昆虫など広範囲に及んでいる。トレハロースのような非還元性糖質は、アミノ酸や蛋白質等のアミノ基を有する物質とアミノカルボニル反応を起こさず、含アミノ酸物質を損なわないことから、褐変、劣化を懸念することなく利用、加工できることが期待され、その工業的製造方法の確立が望まれている。

【0003】トレハロースの製造方法としては、例えば、特開昭50-154485公報で報告されている微生物菌体を用いる方法や、特開昭58-216695公報で提案されているマルトース・ホスホリラーゼとトレハロース・ホスホリラーゼとの組合せでマルトースを変換する方法などが知られている。しかしながら、微生物菌体を用いる方法は、該菌体を出発原料とし、これに含まれるトレハロースの含量が、通常、固形物当たり15w

／w% (以下、本明細書では、特にことわらない限り、w/w%を単に%と略称する) 未満と低く、その上、これを抽出、精製する工程が煩雑で、工業的製造方法としては不適である。また、マルトース・ホスホリラーゼおよびトレハロース・ホスホリラーゼを用いる方法は、いずれもグルコース-1リン酸を経由しており、その基質濃度を高めることが困難であり、また、両酵素の反応系が可逆反応で目的物の生成率が低く、更には、両酵素の反応系を安定に維持して反応をスムーズに進行させることが困難であって、未だ、工業的製造方法として実現するに至っていない。

【0004】これに関係して、『月刊フードケミカル』、8月号、第67乃至72頁(1992年)、「澱粉利用開発の現状と課題」の「オリゴ糖」の項において、「トレハロースについては著しく広い応用範囲が考えられるが、本糖の澱粉糖質からの直接糖転移、加水分解反応を用いた酵素的生産は、現在のところ学術的には不可能であるといわれている。」と記載されているように、澱粉を原料とし、酵素反応によってトレハロースを製造することは、従来、学術的にも不可能であると考えられてきた。

【0005】一方、澱粉を原料として製造される澱粉部分分解物、例えば、澱粉液化物、各種デキストリン、各種マルトオリゴ糖などは、通常、その分子の末端に還元基を有し還元性を示すことが知られている。このような澱粉部分分解物を、本明細書では、還元性澱粉部分分解物と称する。一般に、還元性澱粉部分分解物は、固形物当りの還元力の大きさをデキストロース・エクイバレント(Dextrose Equivalent, DE)として表している。この値の大きいものは、通常、分子が小さく低粘度で、甘味が強いものの、反応性が強く、アミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起こし易く、褐変し、悪臭を発生して、品質を劣化し易い性質のあることが知られている。

【0006】このような還元性澱粉部分分解物の種々の特性は、DEの大小に依存しており、還元性澱粉部分分解物とDEとの関係は極めて重要である。従来、当業界では、この関係を断ち切ることは不可能とさえ信じられてきた。

【0007】還元性澱粉部分分解物とDEとの関係を断ち切る唯一の方法は、還元性澱粉部分分解物を高圧水素添加法などによって、その還元基を糖アルコールに変換して非還元性糖質にする方法である。しかし、この方法は、高圧オートクレーブを必要とし、多量の水素やエネルギーを消費するのみならず、防災上からも高度な安全施設や管理を必要としている。その上、得られる還元性澱粉部分分解物の糖アルコールは、原料の還元性澱粉部分分解物がグルコースのみからなるのに対し、グルコースとソルビトールとから構成される点で異なり、それを摂取することによって、一過性ではあるが、難消化、緩

下の症状を起こす懸念もある。従って、還元性澱粉部分分解物の構成糖であるグルコースを変えることなく、その還元力を低減若しくは消滅させる方法の確立が望まれる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、従来信じられてきた還元性澱粉部分分解物とDEとの関係を打破し、還元性澱粉部分分解物の新たな用途を開拓するため、還元性澱粉部分分解物からの非還元性糖質の新規製造方法とその非還元性糖質並びにその用途を提供しようとするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記課題を解決するために、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する全く新しい非還元性糖質生成酵素の実現に期待を込めて、この酵素を産生する微生物を土壌より広く検索してきた。その結果、岡山県岡山市の土壌から、新たに分離した新規微生物、リゾビウム(Rhizobium)属に属する微生物M-11、および岡山県総社市の土壌から新たに分離した新規微生物、アルスロバクター(Arthrobacter)属に属する新規微生物Q36が、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する新規非還元性糖質生成酵素を産生することを見だし、この非還元性糖質生成酵素を還元性澱粉部分分解物に作用させることにより、目指していたトレハロース構造を有する非還元性糖質が容易に製造しうることを見だし、また、還元性澱粉部分分解物に、この非還元性糖質生成酵素を作用させ、次いでグルコアミラーゼまたは α -グルコシダーゼを作用させることにより、容易にトレハロースを製造しうることを見だし、本発明を完成した。更に、この非還元性糖質生成酵素を産生する微生物を、公知菌より広く検索した。その結果、ブレヴィバクテリウム(Brevibacterium)属、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、マイクロコッカス(Micrococcus)属、クルトバクテリウム(Curtobacterium)属、テラバクター(Terrabacter)属に属する微生物も、本発明の非還元性糖質生成酵素を産生することが判明し、前記のリゾビウム属、アルスロバクター属に属する微生物由来の非還元性糖質生成酵素と同様に、還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成することを見だし、本発明を完成した。併せて、この非還元性糖質、これを含む低還元性糖質および／またはトレハロースを含有せしめた飲食物、化粧品、医薬品などの組成物を確立して本発明を完成した。

【0010】次に本発明のリゾビウム属に属する微生物M-11の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』(長谷川武治編、学会出版セン

7

ター、1985年)に準じて行った。

【0011】

【A 細胞形態】

肉汁寒天培養、27℃

通常0.6乃至0.8×1.0乃至1.5μmの桿菌。単独、希に対をなし、連鎖した細胞も観察される。多形性なし。運動性あり。無孢子。鞭毛は周鞭毛。非抗酸性。グラム陰性。カプセル陰性。異染顆粒陽性。Poly-β-hydroxy butyrateを蓄積。

【0012】

【B 培養的性質】

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状 : 円形 大きさは24時間で約1.5mm。

周縁 : 全縁

隆起 : 偏平状ないし半レンズ状

光沢 : あり

表面 : 平滑

色調 : 半透明、クリーム色

(2) デキストロース・トリプトン寒天平板培養、27℃

8

コロニーは半透明、クリーム色、mucoid生成

(3) 酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、27℃

形状 : 円形 大きさは5日で約3mm。

色調 : 半透明、クリーム色、mucoid生成

(4) コンゴレッド含有酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、27℃

コロニーは仄かなピンク色で、ほとんどコンゴレッドを吸収しない。

10 (5) 2w/v%NaCl含有酵母エキス・マンニトール寒天平板培養、27℃

生育する。

(6) 肉汁寒天斜面培養、27℃

生育 : 良好

形状 : 糸状

(7) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

液化しない。

【0013】

【C 生理学的性質】

20

(1) 硝酸塩の還元性	: 陽性
(2) 脱窒反応	: 陰性
(3) メチルレッド試験	: 陰性
(4) VP試験	: 陰性
(5) インドールの生成	: 陰性
(6) 硫化水素の生成	: 陽性
(7) 澱粉の加水分解	: 陰性
(8) クエン酸の利用	: 陽性
(9) 無機窒素源の利用	: アンモニウム塩および硝酸塩と もに利用できる。
(10) 色素の生成	: 可溶性色素の生成はない
(11) ウレアーゼ	: 陽性
(12) オキシダーゼ	: 陰性
(13)カタラーゼ	: 陽性
(14) 生育の範囲	: pH 5.5乃至9.0 温度 4乃至35℃
(15) 酸素に対する態度	: 好気性
(16) 炭素源の利用性と酸生成の有無	
	利用性 酸生成
D-グルコース	利用する 陽性
D-ガラクトース	利用する 陽性
D-フラクトース	利用する 陽性
L-アラビノース	利用する 陽性
D-キシロース	利用する 陽性
L-ラムノース	利用する 陽性
マルトース	利用する 陰性
スクロース	利用する 陽性
ラクトース	利用する 陰性
トレハロース	利用する 陰性
ラフィノース	利用する 陽性

- | | | | |
|------|--------------|--|----|
| | マンニトール | 利用する | 陰性 |
| | デキストリン | 利用する | 陰性 |
| | ズルシトール | 利用する | 陰性 |
| (17) | アミノ酸の脱炭酸試験 | : L-リジン、L-アルギニン、
L-オルニチンいずれに対しても陰性。 | |
| (18) | アミノ酸の利用 | : L-グルタミン酸ナトリウム、
L-アスパラギン酸ナトリウム、
L-ヒスチジン、L-プロリンいずれも利用する。 | |
| (19) | DNase | : 陰性 | |
| (20) | 3-ケトラクトースの生成 | : 陰性 | |
| (21) | DNAのG-C含量 | : 61% | |

【0014】以上の菌学的性質に基づいて、『バーゼ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオリジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)』、第1巻(1984年)を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、リゾビウム属に属する微生物であることが判明した。本菌は、リゾビウム・メリロット (*Rhizobium meliloti*) に近い性質を示すものの、この菌とは違って、マルトース、ラクトース、マンニトールから酸を生成しない点に違いが認められ、また、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

【0015】これらの結果より本発明者等は、本菌を新規微生物リゾビウム・スピーシーズ (*Rhizobium* sp.) M-11と命名し、平成4年12月24日付で、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託し、微生物受託番号 微工研条寄第4130号 (FERM BP-4130) として受託された。

【0016】本発明では、上記菌のみならず、リゾビウム属に属し、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を産生する他の菌株、更には、それら菌株の変異株なども適宜用いられる。

【0017】次に本発明のアスロバクター属に属する微生物Q36の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、リゾビウム属に属するM-11の場合と同様に、『微生物の分類と同定』、(長谷川武治編、学会出版セ

ンター、1985年)に準拠して行った。

【0018】

【A 細胞形態】

(1) 肉汁寒天培養、27℃

通常0.5乃至0.7×0.8乃至1.6μm桿菌。単独。多形性あり。運動性なし。無孢子。鞭毛なし。非抗酸性。グラム陽性。カプセル陰性。

(2) EYG寒天培養、27℃

桿菌-球菌の生育サイクルを示す。

【0019】

【B 培養的性質】

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状 : 円形。大きさは3日間で2乃至2.5mm。

周縁 : 全縁

隆起 : 半レンズ状

光沢 : 湿光

表面 : 平滑

色調 : 半透明、白色乃至淡い黄色

(2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

生育度 : 良好

形状 : 糸状

(3) 酵母エキスーベpton寒天斜面培養、27℃

生育度 : 良好

形状 : 糸状

(4) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

液化する。

【0020】

【C 生理学的性質】

- | | | |
|-----|----------|------|
| (1) | 硝酸塩の還元性 | : 陽性 |
| (2) | 脱窒反応 | : 陰性 |
| (3) | メチルレッド試験 | : 陰性 |
| (4) | VP試験 | : 陽性 |
| (5) | インドールの生成 | : 陰性 |
| (6) | 硫化水素の生成 | : 陽性 |
| (7) | 澱粉の加水分解 | : 陰性 |
| (8) | セルロースの分解 | : 陰性 |
| (9) | クエン酸の利用 | : 陽性 |

11

12

- | (10) | 無機窒素源の利用 | : アンモニウム塩および硝酸塩と
もに利用できる。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|----------------|---|--|-----|-----|---------|------|----|----------|------|----|----------|------|----|----------|------|----|---------|------|----|---------|------|----|-------|------|----|-------|------|----|-------|------|----|--------|------|----|--------|------|----|--------|------|----|--------|------|----|
| (11) | 色素の生成 | : なし | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (12) | ウレアーゼ | : 陽性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (13) | オキシダーゼ | : 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (14) | カタラーゼ | : 陽性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (15) | 生育の範囲 | : pH 5乃至10
温度 4乃至37℃ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (16) | 酸素に対する態度 | : 好気性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (17) | 炭素源の利用性と酸生成の有無 | <table border="0"> <tr> <th></th> <th>利用性</th> <th>酸生成</th> </tr> <tr> <td>D-グルコース</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>D-ガラクトース</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>D-フラクトース</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>L-アラビノース</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>D-キシロース</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>L-ラムノース</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>マルトース</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>スクロース</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>ラクトース</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>ラフィノース</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>マンニトール</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>デキストリン</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> <tr> <td>ズルシトール</td> <td>利用する</td> <td>陰性</td> </tr> </table> | | 利用性 | 酸生成 | D-グルコース | 利用する | 陰性 | D-ガラクトース | 利用する | 陰性 | D-フラクトース | 利用する | 陰性 | L-アラビノース | 利用する | 陰性 | D-キシロース | 利用する | 陰性 | L-ラムノース | 利用する | 陰性 | マルトース | 利用する | 陰性 | スクロース | 利用する | 陰性 | ラクトース | 利用する | 陰性 | ラフィノース | 利用する | 陰性 | マンニトール | 利用する | 陰性 | デキストリン | 利用する | 陰性 | ズルシトール | 利用する | 陰性 |
| | 利用性 | 酸生成 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-グルコース | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-ガラクトース | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-フラクトース | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-アラビノース | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-キシロース | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-ラムノース | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| マルトース | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| スクロース | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ラクトース | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ラフィノース | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| マンニトール | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| デキストリン | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ズルシトール | 利用する | 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (18) | アミノ酸の利用 | : L-グルタミン酸ナトリウム、
L-アスパラギン酸ナトリウム、
L-ヒスチジン、L-プロリン
いずれも利用する。 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (19) | DNase | : 陽性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (20) | 3-ケトラクトースの生成 | : 陰性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (21) | 細胞壁の主要ジアミノ酸 | : リジン | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (22) | DNAのG-C含量 | : 63% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

【0021】以上の菌学的性質をもとにして、『バーヂーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)』、第2巻(1984年)を参考にして、公知の菌株とその異同を検討した。その結果、本菌は、アルスロバクター (Arthrobacter) 属に属する微生物であることが判明した。また、本菌は、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

【0022】これらの結果より本発明者等は、本菌を新規微生物アルスロバクター・スピーシーズ (Arthrobacter sp.) Q36と命名し、平成5年6月3日付けで、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、受託番号 FERMBP-4316として受託された。

【0023】本発明では上記菌株のみならず、アルスロ

バクター属に属し、還元性澱粉部分分解物からトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する非還元性糖質生成酵素を産生する他の菌株、更には、それら菌株の変異株なども適宜用いられる。

【0024】本発明に用いられる微生物としては、本発明の非還元性糖質生成酵素産生能を有するものであればよく、例えば、前記の新規微生物リゾビウム・スピーシーズM-11 FERM BP-4130およびアルスロバクター・スピーシーズQ36 FERM BP-4316だけでなく、公知微生物であるブレヴィバクテリウム・ヘロボルム (Brevibacterium helvolum) ATCC11822、フラボバクテリウム・アクアティレ (Flavobacterium aquatile) IFO3772、マイクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) IFO3064、マイクロコッカス・ロゼウス (Micrococcus roseus) ATCC186、クルトバクテリウム・シトレウム (Curtobacteri

um citreum) IFO15231、マイコバクテリウム・スメグマチス (Mycobacterium smegmatis) ATCC19420、テラバクター・ツメスセンス (Terrabacter tumescens) IFO12960なども有利に利用できる。

【0025】本発明の微生物の培養に用いる培地は、微生物が生育でき、本発明の非還元性糖質生成酵素を産生しうる栄養培地であればよく、合成培地および天然培地のいずれでもよい。炭素源としては、微生物が資化する物であればよく、例えば、グルコース、フラクトース、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜、還元性澱粉部分分解物などの糖質、また、クエン酸、コハク酸などの有機酸も使用することができる。培地におけるこれらの炭素源の濃度は炭素源の種類により適宜選択される。例えば、還元性澱粉部分分解物の場合には、通常、20%以下が望ましく、菌の生育および増殖からは5%以下が好ましい。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および、例えば、尿素、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。また、無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などが適宜用いられる。更に、必要に応じて、アミノ酸、ビタミンなども適宜用いられる。

【0026】培養は、通常、温度4乃至40℃、好ましくは20乃至37℃、pH4乃至10、好ましくは5乃至9から選ばれる条件で好行的に行われる。培養時間は微生物が増殖し始める時間以上の時間であればよく、好ましくは10時間乃至100時間である。また、培養液の溶存酸素濃度には特に制限はないが、通常は、0.5乃至20ppmが好ましい。そのために、通気量を調節したり、攪拌したり、通気に酸素を追加したり、また、ファーマンター内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

【0027】このようにして、微生物を培養した後、本発明の酵素を回収する。本酵素活性は、培養物の菌体および除菌液いずれにも認められ、菌体および除菌液を粗酵素液として採取することも、また、培養物全体を粗酵素液として用いることもできる。培養物から菌体を除去するには公知の固液分離法が採用される。例えば、培養物そのものをそのまま遠心分離する方法、あるいは、プレコートフィルターなどを用いて濾過分離する方法、平膜、中空糸膜などの膜濾過により分離する方法などが適宜採用される。除菌液をそのまま酵素液として用いることができるが、一般的には、濃縮して用いられる。濃縮方法としては、例えば、硫酸塩析法、アセトンおよびア

ルコール沈殿法、平膜、中空糸膜など膜濃縮法などが採用される。

【0028】更に、除菌液およびその濃縮物を公知の方法により固定化することもできる。例えば、イオン交換体への結合法、樹脂および膜などの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが採用される。また、培養物から分離した菌体もそのまま粗酵素として用いることができるが、これを固定化して用いてもよい。一例として、これをアルギン酸ナトリウムと混合して、塩化カルシウム溶液中に滴下して粒状にゲル化させて固定化する。この粒状化物をさらにポリエチレンイミン、グルタルアルデヒドで処理して固定化してもよい。菌体から酵素を抽出して、その抽出液を粗酵素液として用いることもできる。例えば、超音波による破碎法、ガラスビーズおよびアルミナによる機械的破碎法、フレンチプレスによる破碎法などで菌体から酵素を抽出し、遠心分離または膜濾過などで清澄な粗酵素液を得ることができる。

【0029】本酵素液はそのまま用いることができるが、公知の方法によって更に精製して利用することもできる。一例として、培養液の処理物を硫酸塩析して濃縮した粗酵素標品を透析後、DEAE-トヨパール樹脂を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、続いて、ブチルトヨパール樹脂を用いた疎水カラムクロマトグラフィー、トヨパール HW-55樹脂を用いたゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製することにより、電気泳動的に単一の酵素を得ることができる。

【0030】このようにして得られる本発明の非還元性糖質生成酵素は、下記の理化学的性質を有する。

(1) 作用

グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有する非還元性糖質を生成する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約76,000乃至87,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.6乃至4.6。

(4) 至適温度

pH7.0、60分間反応で、35乃至40℃付近。

(5) 至適pH

40℃、60分間反応で、pH約6.4乃至7.2。

(6) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、35乃至40℃付近まで安定。

(7) pH安定性

25℃、16時間保持で、pH約5.5乃至11.0。

【0031】本発明の非還元性糖質生成酵素の活性測定方法は、基質としてマルトペンタオース1.25w/v

% (50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0) 4 ml に酵素液を 1 ml 加え 40℃ で 60 分間反応させた後、100℃ で 10 分間加熱して反応を停止させ、その反応液を正確に脱イオン水で 10 倍に希釈し、その希釈液の還元力をソモギー・ネルソン法にて測定する。対照として、あらかじめ 100℃ で 10 分間加熱することにより失活させた酵素液を用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、1 分間に 1 μ mol のマルトペンタオースに相当する還元力を減少させる酵素量を 1 単位と定義した。

【0032】本酵素の基質としては、澱粉、アミロペクチン、アミロースなどの澱粉をアミラーゼまたは酸などによって部分的に加水分解して得られる還元性澱粉部分分解物が用いられる。アミラーゼで分解した直鎖または枝分かれ構造を有する還元性澱粉部分分解物としては、例えば、『ハンドブック・オブ・アミレーシズ・アンド・リレイテッド・エンザイムズ (Handbook of Amylases and Related Enzymes)』(1988 年) パーガモン・プレス社 (東京) に記載されている、 α -アミラーゼ、マルトトリオース生成アミラーゼ、マルトテトラオース生成アミラーゼ、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼなどのアミラーゼで分解した還元性澱粉部分分解物を用いる。更には、還元性澱粉部分分解物を調製する際、ブルナーゼおよびイソアミラーゼなどの枝切り酵素を作用させることも随意である。また、還元性澱粉部分分解物として、マルトオリゴ糖、例えば、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどの 1 種または 2 種以上を用いることも有利に実施できる。

【0033】基質濃度は特に限定されない。例えば、0.1% の基質溶液として用いた場合でも、本酵素の反応は進行するが、工業的には、2% 以上、望ましくは、5 乃至 50% の高濃度反応が好適であり、トレハロース構造を有する非還元性糖質を有利に生成できる。また、基質溶液中に完全に溶解できない不溶性基質を含有するものであってもよい。反応温度は酵素反応が進行する温度、すなわち 55℃ 附近までで行えばよいが、好ましくは 40 乃至 50℃ 付近の温度を用いる。反応 pH は、通常、5 乃至 10 の範囲に調整すればよいが、好ましくは約 pH 6 乃至 8 の範囲に調整する。反応時間は酵素反応の進行により適宜選択する。

【0034】上記の反応によって得られた非還元性糖質を含む反応液は、基質に用いた還元性澱粉部分分解物と比較して、顕著に還元力が低下している。例えば、基質にマルトペンタオースを用いた場合、本酵素反応により反応液が示す還元力は、基質マルトペンタオース溶液の示す始発還元力の約 93% が消失し、約 7% にまで低下する。

【0035】反応液は、常法により、濾過、遠心分離などして不溶物を除去した後、活性炭で脱色、H 型、OH 型イオン交換樹脂で脱塩して精製し、濃縮し、シラップ状製品とする。更に、乾燥して粉末状製品にすることも随意である。必要ならば、更に、精製、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコールおよびアセトンなど有機溶媒による分別、適度な分離性能を有する膜による分離、更には、酵母での発酵処理、アルカリ処理などによる残存している還元性糖質の分解除去などの方法を 1 種または 2 種以上組み合わせて精製することにより、最高純度の非還元性糖質製品を得ることも容易である。

【0036】とりわけ、工業的大量生産方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーの採用が好適であり、例えば、特開昭 58-23799 号公報、特開昭 58-72598 号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより夾雑糖類を除去し、目的物の含量を向上させた非還元性糖質を有利に製造することができる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

【0037】このようにして得られた本発明のトレハロース構造を有する非還元性糖質またはこれを含む低還元性糖質を、必要により、アミラーゼ、例えば、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼなどや、または α -グルコシダーゼで分解し、甘味性、還元力などを調整したり、粘性を低下させたりすることも、また、水素添加して残存する還元性糖質を糖アルコールにして還元力を消滅せしめることなどの更なる加工処理を施すことも随意である。

【0038】とりわけ、本発明の非還元性糖質またはこれを含む低還元性糖質に対して、グルコアミラーゼまたは α -グルコシダーゼを作用させることにより容易にトレハロースを製造することができる。即ち、これらの非還元性または低還元性糖質にグルコアミラーゼまたは α -グルコシダーゼを作用させてトレハロースとグルコースとの混合溶液とし、これを、前述の精製方法、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどにより、グルコースを除去し、トレハロース高含有画分を採取する。これを精製、濃縮して、シラップ状製品を得ることも、更に濃縮して過飽和にし、晶出させてトレハロース含水結晶または無水トレハロース結晶を得ることも有利に実施できる。

【0039】トレハロース含水結晶を製造するには、例えば、純度約 60% 以上、濃度約 65 乃至 90% のトレハロース高含有液を助晶缶にとり、0.1 乃至 20% の種晶共存下で、温度 95℃ 以下、望ましくは 10 乃至 90℃ の範囲で、攪拌しつつ徐冷し、トレハロース含水結

晶を含有するマスキットを製造する。マスキットからトレハロース含水結晶またはこれを含有する含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など公知の方法を採用すればよい。

【0040】分蜜方法の場合には、通常、マスキットをバスケット型遠心分離機にかけ、トレハロース含水結晶と蜜（母液）とを分離し、必要により、該結晶に少量の冷水をスプレーして洗浄することも容易な方法であり、より高純度のトレハロース含水結晶を製造するのに好適である。噴霧乾燥方法の場合には、通常、濃度70乃至85%、晶出率20乃至60%程度のマスキットを高圧ポンプでノズルから噴霧し、結晶粉末が溶解しない温度、例えば、60乃至100℃の熱風で乾燥し、次いで30乃至60℃の温風で約1乃至20時間熟成すれば非吸湿性または難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。また、ブロック粉碎方法の場合には、通常、水分10乃至20%、晶出率10乃至60%程度のマスキットを約0.1乃至3日間静置して全体をブロック状に晶出固化させ、これを粉碎または切削などの方法によって粉末化し乾燥すれば、非吸湿性または難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。

【0041】また、無水結晶トレハロースを製造するには、トレハロース含水結晶を乾燥して変換させることもできるが、一般的には、水分10%未満の高濃度トレハロース高含有溶液を助晶缶にとり、種晶共存下で50乃至160℃、望ましくは80乃至140℃の範囲で攪拌しつつ無水結晶トレハロースを含有するマスキットを製造し、これを比較的高温乾燥条件下で、例えば、ブロック粉碎、流動造粒、噴霧乾燥などの方法で晶出、粉末化して製造される。

【0042】このようにして製造される本発明の非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびトレハロースは、原料の還元性澱粉部分分解物と比較して、還元性が低く安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有する物質と混合、加工しても、褐変することも、異臭を発生することもなく、混合した他の素材を損なうことも少ない。また、還元性澱粉部分分解物の場合とは違って、還元力が、低いにもかかわらず低粘度であり、平均グルコース重合度が低いものの場合には、良質で上品な甘味を有している。

【0043】更に、アミラーゼ、例えば、すい臓由来 α -アミラーゼにより分解し、低分子非還元性オリゴ糖や低分子マルトオリゴ糖を生成し、また、これらオリゴ糖も、 α -グルコシダーゼや小腸酵素でも容易に分解し、グルコース及びトレハロースを生成し、更に、生成したトレハロースはトレハラーゼにより容易にグルコースにまで分解することから、経口摂取により、消化吸収され、カロリー源として利用される。虫歯誘発菌などによって、醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料とし

ても利用できる。

【0044】また、安定な甘味料であることにより、結晶製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤の糖衣剤として利用することも有利に実施できる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他の糖の晶出防止性、難澱酵性、糊化澱粉の老化防止性などの性質を具備している。

【0045】また、無水結晶トレハロースの場合には、食品、医薬品、化粧品、その原材料、または加工中間物などの含水物の脱水剤としても有利に利用でき、安定で高品質の粉末、顆粒、錠剤など固状物を容易に製造することができる。

【0046】従って、本発明の非還元性糖質、またはこれを含む低還元性糖質およびこれらから製造されるトレハロースは、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤、脱水剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0047】本発明の非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびこれらから製造されるトレハロースは、そのまま甘味付のための調味料として使用することができる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、マルトース、蔗糖、異性化糖、蜂蜜、メープルシュガー、イソマルトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ラクトスクロース、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 α -グリコシルステビオシド、レバウディオシド、グリチルリチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の1種または2種以上の適量と混合して使用してもよく、また必要ならば、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と混合して使用することもできる。

【0048】また、本発明の非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびこれらから製造されるトレハロースの粉末乃至結晶状製品は、そのまま、または必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成型して使用することも随意である。

【0049】また、本発明の非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびこれらから製造されるトレハロースの甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種物質とよく調和し、而酸性的、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。

【0050】例えば、アミノ酸、ペプチド類、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、

焼肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、核酸系調味料、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなど各種調味料として有利に使用できる。

【0051】また、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンディーなどの洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペースト、スプレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢こんぶ、さきすめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、こんぶ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、合成酒、洋酒などの酒類、コーヒー、紅茶、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品などの各種飲食物への甘味付に、呈味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。

【0052】また、家畜、家禽、その他蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のために飼料、餌料などの嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、または呈味改良剤、矯味剤として、さらには品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。

【0053】品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失い易い各種生理活性物質またはこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロン α 、 β 、 γ 、ツモア・ネクロシス・ファクター α 、 β 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキンIなどのリンホカイン、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチ

ン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、スプレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン、リパーゼ、エラスターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌、ローヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状または固状の健康食品や医薬品などに容易に製造できることとなる。

【0054】以上述べたような各種組成物にトレハロース構造を有する非還元性糖質、これを含む低還元性糖質、およびこれらから製造されるトレハロースを含有せしめる方法は、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶出、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常0.1%以上、望ましくは1%以上含有せしめるのが好適である。

【0055】次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

【0056】まず、新規微生物リゾビウム・スピーシーズ M-11からの非還元性糖質生成酵素の生産、精製およびその性質などを説明し、次いで、アルスロバクター・スピーシーズ Q36からの非還元性糖質生成酵素について同様に説明する。更に、公知微生物からの非還元性糖質生成酵素について説明する。

【0057】

【実験1 リゾビウム・スピーシーズ M-11からの非還元性糖質生成酵素の生産】マルトース2.0w/v%、ペプトン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、リン酸二ナトリウム0.1w/v%、リン酸一カリウム0.1w/v%および水からなる液体培地をpH7.0に調整した。500ml容三角フラスコにこの培地を約100mlずつ入れ、オートクレーブで120℃で20分間滅菌し、冷却して、リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130) を接種し、27℃、130rpmで24時間培養したものを種培養液とした。

【0058】容量30lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地約20lを入れて滅菌、冷却して温度30℃とした後、種培養液1w/v%を接種し、温度30℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、約24時間通気攪拌培養した。培養液の本酵素活性は約1.5単位/mlであった。培養液の一部を採り遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を50mMリン酸緩衝

液 (pH 7.0) で元の培養液と同じ量の懸濁液とした後、菌体懸濁液と培養液上清の酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には約0.6単位/mlの酵素活性が、また、培養液上清には約0.9単位/mlの酵素活性が認められた。

【0059】

【実験2 酵素の精製】実験1で得られた培養液約181を超高圧菌体破碎装置ミニラボ (大日本製薬株式会社製) で処理し、含まれる菌体を破碎した。処理液を遠心分離 (10,000rpm、30分間) することにより、約161の上清を得た。その液に飽和度0.2になるように硫酸を溶解させ、4℃、1時間放置した後、遠心分離 (10,000rpm、30分間) することにより上清を回収した。

【0060】更に、その液に飽和度0.6になるように硫酸を溶解させ、4℃、24時間放置した後、遠心分離 (10,000rpm、30分間) して硫酸塩析物を回収した。得られた硫酸塩析物を10mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離 (10,000rpm、30分

間) して不溶物を除いた。その透析液 (360ml) を2回に分けて、DEAE-トヨパールゲル (東ソー株式会社製造) を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー (ゲル量300ml) を行った。

【0061】本酵素はDEAE-トヨパールゲルに吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから溶出した。得られる酵素活性画分を、2M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、その透析液を遠心分離 (10,000rpm、30分間) して不溶物を除き、得られる上清をブチルトヨパール650ゲル (東ソー株式会社製造) を用いた疎水カラムクロマトグラフィー (ゲル量300ml) を行った。吸着した本酵素を硫酸2Mから0Mのリニアグラジエントによりカラムから溶出させ、酵素活性画分を回収した。続いて、トヨパールHW-55樹脂 (東ソー株式会社製造) を用いたゲル濾過クロマトグラフィー (ゲル量300ml) を行い、酵素活性画分を回収した。精製の各工程における酵素活性量、比活性、収率を表1に示す。

【0062】

【表1】

工程	酵素活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白質)	収率 (%)
培養液	26,800		100
破碎後の上清	20,300	0.10	78
硫酸塩析後の透析液	16,100	0.32	60
イオン交換カラム溶出液	11,300	5.5	42
疎水カラム溶出液	5,730	98	21
ゲル濾過溶出液	3,890	196	16

【0063】表1の工程でゲル濾過溶出液として得られた精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル (ゲル濃度7.5%) を用いる電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

【0064】

【実験3 酵素の性質】実験2で得られた精製酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル (ゲル濃度10%) を用いる電気泳動法に供し、同時に泳動した分子量マーカー (日本バイオ・ラド・ラボラトリーズ株式会社製) と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約77,000乃至87,000ダルトンであった。

【0065】精製酵素標品をポリアクリルアミドゲル (2%アンフォライン含有、スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製) を用いる等電点電気泳動法に供し、泳動後、ゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は約3.6乃至4.6であった。

【0066】本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響は活性測定方法に準じて調べた。結果を図1 (温度の

影響)、図2 (pHの影響) に示した。酵素の至適温度は、pH 7.0、60分間反応で、40℃付近、至適pHは、40℃、60分間反応で、約7.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液 (50mMリン酸緩衝液を含む、pH 7.0) を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの50mM緩衝液中で25℃、16時間保持した後、pHを7に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図3 (温度安定性)、図4 (pH安定性) に示した。本酵素の温度安定性は40℃付近まで安定であり、pH安定性は約6乃至9であった。

【0067】

【実験4 非還元性糖質の調製】基質として、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、またはマルトヘプタオースの20%水溶液を調製し、それぞれに実験2で得られた精製酵素を基質固形物グラム当たり2単位の割合で加え、40℃、pH 7.0で48時間作

用させた後、脱塩し、ワコービーズ WB-T-330 カラム（和光純薬工業株式会社製）を用いた高速液体クロマトグラフィーで反応生成物を分析した。高速液体クロマトグラフィーは、室温下で行い、溶離液として水を流速0.5ml/分で流し、示差屈折計RI-8012

（東ソー株式会社製造）で分析した。その結果を表2に示す。

【0068】

【表2】

基質	反応物	HPLC 溶出時間 (分)	組成比 (%)
グルコース	グルコース	33.4	100.0
マルトース	マルトース	28.5	100.0
マルトトリオース	PI	23.3	35.0
	マルトトリオース	25.9	65.0
マルトテトラオース	PII	21.6	85.6
	マルトテトラオース	24.1	14.4
マルトペンタオース	PIII	19.7	92.7
	マルトペンタオース	22.6	7.3
マルトヘキサオース	PIV	18.7	93.5
	マルトヘキサオース	21.4	6.5
マルトヘプタオース	PV	17.8	93.4
	マルトヘプタオース	21.0	6.7

（注）表中、PI、PII、PIII、PIV、PVは、それぞれの基質、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースから新たに生成した糖質を意味する。

【0069】表2の結果から明らかなように、反応物中には残存するそれぞれの基質と新たに生成したそれぞれの糖質PI、PII、PIII、PIV、PVからなり、それ以外の糖質はほとんど検出されない。それぞれの生成率はグルコース重合度3のPIが比較的低いものの、グルコース重合度4以上のPII、PIII、PIV、PVは85%以上の高い生成率であることが半明した。なお、グルコース、マルトースからは、新たな糖質を生成しないことが半明した。

【0070】それぞれの反応物から新たに生成した糖質を精製するため、脱色、脱塩、濃縮後、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂（XT-1016、Na⁺型、架橋度4%、東京有機化学工業株式会社製造）を用いたカラム分画を行った。樹脂を内径2.0cm、長さ1mのジャケット付ステンレス製カラム3本に充填し、直列につなぎ、カラム内温度を55℃に維持しつつ、反応糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.13で流して分画し、新たに生成した糖質含量97%以上の高純度画分を採取した。得られた高純度画分を真空乾燥し、それぞれ高純度糖質標品を調製した。基質原料に対する収率は、固形物換算で、それぞれ

PIで約9%、PIIで約65%、PIIIで約82%、PIVで約80%、PVで約77%であった。その純度は、それぞれPIで97.5%、PIIで98.6%、PIIIで99.5%、PIVで98.4%、PVで98.4%であった。

【0071】またこれらの新たに生成した高純度糖質標品の還元力をソモギー・ネルソン法で測定し、DEで表した。結果は表3にまとめた。

【0072】

【表3】

糖質標品	純度 (%)	DE
PI	97.5	0.83
PII	98.6	0.35
PIII	99.5	0.10
PIV	98.4	0.27
PV	98.4	0.23

【0073】表3の結果から明らかなように、いずれの

標品にも僅かな還元力しか認められなかった。その僅かな還元力は、その標品中に微量に混入、残存している基質由来の還元性マルトオリゴ糖に起因するものと推定され、新たに生成した糖質はいずれも実質的に非還元性であると判断される。

【0074】

【実験5 メイラード反応】実験4において調製した糖質標品、P I、P I I、P I I I、P I V、またはP Vの10%とグリシン1%と、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)とを含む溶液を100℃で90分間保ち、冷却後、この溶液の480nm、1cmセルにおける吸光度を測定した。対照として、それぞれの原料であるマルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、またはマルトヘプタオースを用いて、同様に、処理し、480nmにおける吸光度を測定した。それらの結果を表4に示す。

【0075】

【表4】

糖質標品	着色度 (480nm)	判定
P I	0.027	本発明
P I I	0.018	本発明
P I I I	0.012	本発明
P I V	0.016	本発明
P V	0.015	本発明
マルトトリオース	0.823	対照
マルトテトラオース	0.475	対照
マルトペンタオース	0.369	対照
マルトヘキサオース	0.318	対照
マルトヘプタオース	0.271	対照

糖質標品	グルコース (%)	トレハロース (%)	組成モル比 (グルコース/トレハロース)
P I	38.2	63.8	1.07
P I I	52.0	48.0	2.08
P I I I	61.4	38.6	3.02
P I V	68.3	31.7	4.09
P V	72.9	27.1	5.11

【0079】表5の結果から明らかなように、グルコアミラーゼにより、非還元性糖質P Iはグルコース1分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質P I Iはグルコース2分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質P I I Iはグルコース3分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質P I Vはグルコース

【0076】表4の結果から明らかなように、新たに生成した非還元性糖質標品、P I、P I I、P I I I、P I V、P Vのいずれもメイラード反応による着色度は極めて低く、それぞれ原料の基質であるマルトオリゴ糖の着色度の僅かに3乃至6%程度であり、本発明の新規酵素によって生成する非還元性糖質はメイラード反応をほとんど示さない糖質であることが判明した。

【0077】

【実験6 グルコアミラーゼによる酵素分解】実験4において調製した非還元性糖質標品、P I、P I I、P I I I、P I Vまたは、P Vのそれぞれ50mgを、50mM酢酸緩衝液(pH4.5)1mlに溶解し、1単位のグルコアミラーゼ(生化学工業株式会社製造)を加え、40℃で6時間保ち、酵素分解した後、高速液体クロマトグラフィーで分解物を分析したところ、いずれの標品からも分解物としてグルコースとトレハロースのみが検出された。検出されたグルコース含量、トレハロース含量、その組成モル比の結果を表5に示す。

【0078】

【表5】

4分子とトレハロース1分子に分解され、非還元性糖質P Vはグルコース5分子とトレハロース1分子に分解されることが判明した。

【0080】また、グルコアミラーゼの反応特性を考慮すると、これら非還元性糖質の構造はトレハロース分子にグルコース分子が $\alpha-1, 4$ -結合、もしくは $\alpha-$

1, 6-結合で結合した糖質で、それぞれ、P I はトレハロース1分子にグルコース1分子が結合したグルコース重合度3の非還元性糖質で、P I I はトレハロース1分子にグルコース2分子が結合したグルコース重合度4の非還元性糖質で、P I I I はトレハロース1分子にグルコース3分子が結合したグルコース重合度5の非還元性糖質で、P I V はトレハロース1分子にグルコース4分子が結合したグルコース重合度6の非還元性糖質で、P V はトレハロース1分子にグルコース5分子が結合したグルコース重合度7の非還元性糖質であると判断される。なお、同様に、非還元性糖質標品、P I、P I I、P I I I、P I V、またはP V に β -アミラーゼを作用させたところ、非還元性糖質P I、P I I は分解されず、P I I I はマルトースの1分子とP I の1分子に分解され、P I V はマルトースの1分子とP I I の1分子に分解され、P V はマルトースの2分子とP I の1分子に分解されることが半明した。

【0081】以上の結果から、本発明の非還元性糖質生成酵素による反応は、基質の低分子化および高分子化を伴わない、換言すれば、グルコース重合度の変化を伴わない、分子内変換反応と判断され、また、この非還元性糖質生成酵素によって生成した非還元性糖質、P I、P I I、P I I I、P I V およびP V は、それぞれ、 α -グルコシルトレハロース、 α -マルトシルトレハロース、 α -マルトトリオシルトレハロース、 α -マルトテトラオシルトレハロースおよび α -マルトペンタオシル

トレハロースで示される α -グリコシルトレハロース (G_n-T : 但し、Gはグルコース残基を意味し、nは1以上の整数を意味し、Tは α 、 α -トレハロースを意味する。) であると判断される。

【0082】

【実験7 各種の酵素による分解】実験4において調製した非還元性糖質標品、P I、P I I、P I I I、P I V、またはP V のそれぞれを基質として、ブタすい臓由来 α -アミラーゼ (シグマ社販売)、コメ由来 α -グルコシダーゼ (シグマ社販売)、またはラット小腸アセトン粉末酵素 (シグマ社販売) のそれぞれに作用させた後、分解物の糖組成を高速液体クロマトグラフィーで分析した。 α -アミラーゼの反応は、それぞれの基質10mgを、50mMリン酸緩衝液 (pH6.9) 1mlに溶解し、これに、酵素活性1単位加え、37℃で18時間保って行った。 α -グルコシダーゼの反応は、50mM酢酸緩衝液 (pH4.0) を用いた以外、 α -アミラーゼの場合と同様の条件で行った。ラット小腸アセトン粉末酵素の場合も、50mMマレイン酸緩衝液 (pH6.0) を用いた以外、 α -アミラーゼの場合と同様の条件で行った。 α -アミラーゼによる分解物の糖組成を以下の表6に、 α -グルコシダーゼおよびラット小腸アセトン粉末酵素による分解物の糖組成を以下の表7、表8に示す。

【0083】

【表6】

糖質標品	α -アミラーゼによる分解物の糖組成 (%)				
	P I	P I I	G 3	G 2	G 1
P I	97.3	0	2.3	0.4	0
P I I	0	98.8	0.4	0.8	0
P I I I	81.0	4.8	0	33.0	1.2
P I V	47.2	3.3	40.4	7.5	1.6
P V	10.2	44.9	35.3	8.6	1.0

(注) 表中、G 3はマルトトリオースを、G 2はマルトースを、G 1はグルコースを意味する。

【0084】

40 【表7】

糖質標品	α -グルコシダーゼによる分解物の糖組成		
	グルコース (%)	トレハロース (%)	その他 (%)
P I	38.5	63.0	0.5
P I I	52.1	47.6	0.3
P I I I	61.7	38.1	0.2
P I V	69.5	30.2	0.3
P V	71.4	28.3	0.3

【0085】

【表8】

糖質標品	ラット小腸アセトン粉末酵素による分解物の糖組成		
	グルコース (%)	トレハロース (%)	その他 (%)
PI	37.2	62.4	0.4
PII	52.5	47.1	0.4
PIII	62.0	37.6	0.4
PIV	68.8	30.8	0.4
PV	73.4	26.5	0.1

【0086】表6の結果から明らかなように、糖質標品、PI及びPIIは、 α -アミラーゼによりほとんど分解されないものの、糖質標品、PIII、PIV、およびPVは α -アミラーゼにより低分子のオリゴ糖、PI、PII、マルトトリオース、マルトース及びグルコースにまで分解されることが判明した。

【0087】また、表7、表8の結果から明らかなように、糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、PVいずれも α -グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素により、実験6のグルコアミラーゼの場合と同様に、グルコースとトレハロースにまで分解されることが判明した。

【0088】また、同様に α -グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素によって分解されたそれぞれの反応物に、更に、1単位のブタ腎臓由来トレハラーゼ（シグマ社販売）を加え、pH5.7、37℃で18時間作用させ、高速液体クロマトグラフィー法で糖組成を分析したところ、糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、PVいずれの場合も、 α -グルコシダーゼ及びラット小腸アセトン粉末酵素により生成したトレハロースはトレハラーゼによりグルコースにまで分解することが判明した。

【0089】上述のように、

(1) 非還元性糖質生成酵素は、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から、そのグルコース重合度を变化することなく、トレハロース構造を有する非還元性糖質を生成している。

(2) 非還元性糖質PVは、 α -アミラーゼにより、主に非還元性糖質PIIとマルトトリオースを生じ、非還元性糖質PIIは、グルコアミラーゼにより、トレハ

ロース1分子とグルコース2分子を生じている。

これらの結果から、本発明の非還元性糖質生成酵素は、還元性澱粉部分分解物の還元性末端を非還元性のトレハロース構造に分子内変換する全く新しい作用機作の酵素であると判断される。

【0090】

【実験8 急性毒性】7週齢のdd系マウスを使用して、実験4において調製した非還元性糖質標品、PI、PII、PIII、PIV、またはPVを経口投与して急性毒性試験を行った。その結果、これら非還元性糖質はいずれも低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、それらのLD₅₀値は、いずれも50g/kg以上であった。

【0091】

【実験9 アルスロバクター・スピーシーズ Q36からの非還元性糖質生成酵素の生産】リゾビウム・スピーシーズ M-11 (FERM BP-4130) に代えて、アルスロバクター・スピーシーズ Q36 (FERM BP-4316) を用いた以外は、実験1と同様にファーメンターで約72時間培養した。培養液の非還元性糖質生成酵素の酵素活性は、約1.2単位/mlであった。実験1と同様にして菌体懸濁液と培養液上清の酵素活性を測定したところ、それぞれ約0.5単位/mlおよび約0.7単位/mlであった。

【0092】

【実験10 酵素の精製】実験9の方法で得られた培養液約181を用いて、実験2と同様に精製した。精製の各工程結果は表9にまとめた。

【0093】

【表9】

31

32

工程	非還元性糖質生成 酵素の活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白質)	収率 (%)
培養液	21,800		100
破砕後の上清	17,500	0.14	81
硫酸塩析後の透析液	15,700	0.41	73
イオン交換カラム溶出液	12,800	6.5	58
疎水カラム溶出液	8,820	98	41
ゲル濾過溶出液	5,290	201	24

【0094】表9の工程で、ゲル濾過溶出液として得られた精製酵素標品を、実験2の場合と同様に電気泳動法で純度を検定したところ、蛋白バンドは単一であることが示され、得られた酵素標品は電気泳動的に単一の純度の高い標品であった。

【0095】

【実験11 酵素の性質】実験10で得られた精製酵素標品を、実験3の場合と同様に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分子量を測定したところ、約76,000乃至86,000ダルトンであった。また、本精製酵素標品の等電点を実験3の場合と同様に等電点電気泳動法で求めたところ、pI約3.6乃至4.6であった。また、本酵素活性に対する温度の影響、pHの影響、および本酵素の温度安定性、pH安定性について、実験3の場合と同様にして求めた。結果は、温度の影響を図5に、pHの影響を図6に、温度安定性を図7に、pH安定性を図8に示した。

【0096】図から明らかなように酵素の至適温度は40℃付近、至適pHは約6.5乃至7.0である。温度安定性は40℃付近までであり、pH安定性は約6.0乃至9.5である。

【0097】

【実験12 非還元性糖質の調製】実験10で得られた

精製酵素標品を用いて、実験4および実験6の方法に従って、非還元性糖質の調製とその構造確認の実験を行ったところ、リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の場合と同様に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の非還元性糖質を生成することが判明した。

【0098】

【実験13 公知微生物からの非還元性糖質生成酵素の生産とその性質】公知微生物のうち、本発明の非還元性糖質生成酵素産生能の確認された表10に示す特定の微生物を、マイコバクテリウム・スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*) ATCC19420の場合に37℃で培養した以外は、実験1の場合と同様にファーメンターで27℃で72時間培養した。それぞれの培養液約181を用いて、実験2の場合と同様に、培養液を破砕装置にかけ、その上清を硫酸塩析、透析し、更にイオン交換カラムにかけ、部分精製酵素標品を得、その性質を調べた。結果を表10にまとめた。

【0099】

【表10】

微生物名	イオン交換カラム 溶出液 (単位)	至凍温度	至溶 pH	温度安定性	pH安定性
Brev. h.	2, 700	35℃付近	約8.5	35℃付近まで	約5.6乃至11.1
Flav. a.	216	35℃付近	約8.5乃至8.9	35℃付近まで	約8.0乃至9.5
Micr. l.	1, 730	35℃付近	約8.4乃至8.8	35℃付近まで	約8.5乃至8.0
Micr. r.	1, 340	35℃付近	約8.3乃至7.2	35℃付近まで	約6.0乃至11.1
Curt. c.	1, 290	30℃付近	約8.4乃至8.8	35℃付近まで	約8.5乃至7.8
Myc. s.	358	35℃付近	約8.5	35℃付近まで	約8.0乃至9.0
Terr. t.	1, 050	35℃付近	約8.5乃至7.0	35℃付近まで	約8.0乃至9.6
リゾビウム・ スピーシーズ M-11	11, 300	40℃付近	約7.0	40℃付近まで	約8.0乃至9.0
アルスロバクター・ スピーシーズ Q36	12, 800	40℃付近	約8.5乃至7.0	40℃付近まで	約8.0乃至9.5

(注) Brev. h.: *Brevibacterium helvolum* (ATCC11822)
 Flav. a.: *Flavobacterium aquatile* (IFO3772)
 Micr. l.: *Micrococcus luteus* (IFO3064)
 Micr. r.: *Micrococcus roseus* (ATCC188)
 Curt. c.: *Curtobacterium citreum* (IFO15231)
 Myco. s.: *Mycobacterium smegmatis* (ATCC19420)
 Terr. t.: *Terrabacter tumescens* (IFO12980)

【0100】また、これら公知菌由来の部分精製酵素を用いて、実験12の方法に従って、非還元性糖質の調製とその構造確認を行ったところ、いずれの酵素もリゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の場合と同様に、グルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の還元性澱粉部分分解物から末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度3以上から選ばれる1種または2種以上の非還元性糖質を生成することが判明した。

【0101】

【実験14 非還元性糖質生成酵素の部分アミノ酸配列】

(1) N末端アミノ酸配列

実験2の方法で得られたリゾビウム・スピーシーズ M-11由来の精製酵素標品および実験10の方法で得られたアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の精製酵素標品の一部をそれぞれ蒸留水に対して透析した後、蛋白量として約80マイクログラムをN末端アミノ酸配列分析用の試料とした。N末端アミノ酸配列は、プロテインシーケンサー モデル473A (アプライドバイオシステムズ社製造、米国) を用い、N末端から10残基まで分析した。それぞれ得られたN末端配列を表11に示す。

【0102】

【表11】

由来微生物	N末端アミノ酸配列
リゾビウム・ スピーシーズ M-11	バリンまたはメチオニン-アルギニン-トレオニン-プロリン-アラニン-セリン-トレオニン-チロシン-アルギニン-ロイシン-
アルスロバクター・ スピーシーズ Q36	メチオニン-アルギニン-トレオニン-プロリン-バリン-セリン-トレオニン-チロシン-アルギニン-ロイシン-

【0103】表11から明らかなように、N末端アミノ酸配列は、その末端アミノ酸がリゾビウム・スピーシーズ M-11由来酵素の場合バリンまたはメチオニンで、アルスロバクター・スピーシーズ Q36の場合のメチオニンと異なっているものの、分析したアミノ酸配列10残基中の8残基までが一致している。その中でも第2番目のL-アルギニン残基から第4番目のL-プロリン残基まで3残基のアミノ酸配列、および第6番目のL-セリン残基から第10番目のL-ロイシン残基まで5残基のアミノ酸配列は両酵素間で完全に一致している。すなわち、N末端アミノ酸配列は、 X_1 -アルギニン-トレオニン-プロリン- X_2 -セリン-トレオニン-チロシン-アルギニン-ロイシン-（但し、 X_1 はバリンまたはメチオニンを意味し、 X_2 はアラニンまたはバリンを意味する。）の共通配列を有していることが判明した。

【0104】(2) 内部部分アミノ酸配列

実験2の方法で得られたリゾビウム・スピーシーズ M-11由来の精製酵素標品または実験10の方法で得られたアルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の精製酵素標品の一部をそれぞれ10mMトリス・塩酸緩衝液（pH9.0）に対して、透析した後、同緩衝液で約1mg/mlの濃度になるように希釈した。これら試料液（1ml）それぞれに10μgのリジルエンドペプチターゼ（和光純薬株式会社販売）を加え、30℃、22時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相HPLCを行った。リゾビウム・スピーシーズ M-11由来酵素の場合、カプセルパックC18カラム（直径4.6mm×長さ250mm、株式会社資生堂製造）を用い、流速0.6ml/分、室温で、0.1v/v%トリフルオロ酢酸-16v/v%アセトニトリル溶液から0.1v/v%トリフルオロ酢酸-48v/v%アセトニトリル溶液の60分間のリニアグラジエントの条件で行った。アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来酵素の場合、マイクロボンダパックC18カラム（直径2.1mm×長さ150mm、ウオータース社製造、米国）を用い、流速0.9ml/分、室温で、0.1v/v%トリフルオロ酢酸-30v/v%アセトニトリル溶液から0.1v/v%トリフルオロ酢酸-55v/v%アセトニトリル溶液の60分間のリニアグラジエントの条件で行った。カラムから溶出したペプチドは、波長210nmの吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離したそれぞれ3ペプチド〔リゾビウム属酵素由来ペプチド、R37（保持時間約37分）、R40（保持時間約40分）、R42（保持時間約42分）；アルスロバクター属酵素由来ペプチド、A17（保持時間約17分）、A22（保持時間約22分）、A40（保持時間約40分）〕を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200μlの0.1v/v%乃至50v/v%アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ10残基までアミノ酸配列を分析した。得られた内部部分アミノ酸配列を表12に示す。

0分間のリニアグラジエントの条件で行った。カラムから溶出したペプチドは、波長210nmの吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離したそれぞれ3ペプチド〔リゾビウム属酵素由来ペプチド、R37（保持時間約37分）、R40（保持時間約40分）、R42（保持時間約42分）；アルスロバクター属酵素由来ペプチド、A17（保持時間約17分）、A22（保持時間約22分）、A40（保持時間約40分）〕を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200μlの0.1v/v%乃至50v/v%アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ10残基までアミノ酸配列を分析した。得られた内部部分アミノ酸配列を表12に示す。

【0105】

【表12】

【0106】表12から明らかなように、リゾビウム・スピーシーズ M-11酵素のペプチドR37の配列と、アルスロバクター・スピーシーズ Q36酵素のペプチドA17の配列とは完全に一致し、また、ペプチドR40とペプチドA22の配列も完全に一致した。ペプチドR42とペプチドA40とでは、分析した10残基中の7残基が一致している。すなわち、ペプチドR42とペプチドA40の部分アミノ酸配列は、グルタミン酸-グリシン-アルギニン- X_1 -セリン- X_2 -チロシン-アラニン- X_3 -アラニン-（但し、 X_1 は、グリシンまたはグルタミンを意味し、 X_2 はプロリンまたはアルギニンを意味し、 X_3 はバリンまたはグルタミン酸を意味する。）の共通配列を有している。

【0107】以下、本発明の非還元性糖質、それを含む低還元性糖質およびトレハロースの製造方法を実施例Aで、非還元性糖質、それを含む低還元性糖質および/またはトレハロースを含有せしめた組成物を実施例Bで示す。

【0108】

【実施例A-1】リゾビウム・スピーシーズ M-11（FERM BP-4130）を実験1の方法に準じて、ファーメンターで約36時間培養した。培養後、SF膜を用いて除菌濾過し、約18lの培養濾液を回収し、更に、その濾液をUF膜濃縮し、本発明の非還元性

糖質生成酵素濃縮液約11(17.7単位/ml)を回収した。

【0109】6%馬鈴薯澱粉乳を加熱糊化させた後、pH4.5、温度50℃に調整し、これにイソアミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製造)を澱粉グラム当たり2500単位の割合になるように加え、20時間反応させた。その反応液をpH6.0に調整し、オートクレーブ(120℃)を10分間行い、次いで45℃に冷却し、これに α -アミラーゼ(ノボ社製造、商品名ターマミール60L)を澱粉グラム当たり150単位の割合になるよう加え、24時間反応させた。

【0110】その反応液をオートクレーブ(120℃)を20分間行った後、45℃に冷却し、これに上記の方法で調製した非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり1単位の割合になるよう加え、96時間反応させた。その反応液を95℃に加熱し10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度70%のシラップを固形物当り約91%で得た。

【0111】本品は、DE18.8であって、非還元性糖質を固形物当り、PI 8.3%、PII 5.5%、PIII 37.7%、PIV 1.4%、およびPV 1.3%を含有しており、温和で上品な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0112】

【実施例A-2】実施例A-1の方法で得られた糖液を原糖液とし、非還元性糖質の含量を高めるため、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂(XT-1016、Na⁺型、架橋度4%、東京有機化学工業株式会社製造)を用いたカラム分画を行った。樹脂を内径5.4cmのジャケット付ステンレス製カラム4本に充填し、直列につなぎ樹脂層全長20mとした。カラム内温度を55℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに55℃の温水をSV0.13で流して分画し、グルコース及びマルトース高含有画分を除去し、非還元性糖質高含有物を採取した。更に、精製、濃縮し、真空乾燥し、粉碎して、非還元性糖質高含有粉末を固形物当り収率約61%で得た。

【0113】本品は、DE5.7であって、非還元性糖質を、固形物当り、PI 9.3%、PII 7.4%、PIII 55.5%、PIV 2.1%、PV 1.9%を含有しており、実施例A-1と同様に、温和で上品な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0114】

【実施例A-3】33%とうもろこし澱粉乳に最終濃度0.1重量%となるように炭酸カルシウムを加えた後、pH6.5に調整し、これに α -アミラーゼ(ノボ社製造、商品名ターマミール60L)を澱粉グラム当たり0.2重量%になるよう加え、95℃で15分間反応させた。その反応液をオートクレーブ(120℃)を10分間行った後、55℃に冷却し、これに特開昭63-240784号公報で開示されているマルトテトラオース生成アミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製造)を澱粉グラム当たり5単位の割合になるように加え、6時間反応させ、これに α -アミラーゼ(上田化学株式会社製造、商品名 α -アミラーゼ2A)を澱粉グラム当たり30単位加え、更に、65℃で4時間反応させた。その反応液を、オートクレーブ(120℃)を10分間行い、次いで45℃に冷却し、実施例A-1の方法で調製した非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり2単位の割合になるよう加え、64時間反応させた。その反応液を95℃で10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度70%のシラップを固形物当り収率約90%で得た。

【0115】本品は、DE10.5であって、非還元性糖質を、固形物当り、PI 3.7%、PII 43.7%、PIII 1.2%、PIV 1.1%、およびPV 0.6%を含有しており、温和で上品な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0116】

【実施例A-4】実施例A-3の方法で得られた糖液を原糖液とし、本液の非還元性糖質PII(グルコース重合度4)の含量を高めるため、分画用樹脂として、塩型強酸性カチオン交換樹脂(ダウケミカル社販売、商品名ダウエックス50W-X4、Mg⁺⁺型)を用いた以外は、実施例A-2の方法に従ってカラムクロマトグラフィーを行い、非還元性糖質PII高含有画分を採取した。更に、精製、濃縮し、噴霧乾燥して、非還元性糖質高含有粉末を固形物当り収率約40%で得た。

【0117】本品は、非還元性糖質を固形物当り、PI 8.5%、PII 68.0%、PIII 1.4%含有しており、そのDEは、3.5を示し、極めて還元性が少なく、実施例A-3と同様に、温和で上品な甘味を有しており、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0118】

【実施例A-5】マルトペンタオース(株式会社林原生物化学研究所製造)の20%水溶液に実施例A-1の方法で調製した非還元性糖質生成酵素をマルトペンタオー

スグラム当たり1.0単位の割合になるよう加え、45℃で48時間反応させた。反応によりマルトペンタオースの約93%が非還元性糖質PIIIに変換した。その反応液を95℃で10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩し、濃縮した。更に、非還元性糖質PIII（グルコース重合度5）の含量を高めるため実施例A-2と同様に、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂を用いたカラム分画を行い、PIII高含有画分を採取した。本画分溶液を精製、濃縮し、噴霧乾燥して、高純度非還元性糖質粉末を固形物当たり収率約55%で得た。

【0119】本品は、非還元性糖質を、固形物当たりPIII、99.0%を含有しており、そのDEは、約0.2%未満しか示さず、極めて還元性が低い。本品は、かすかな甘味を有しており、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0120】

【実施例A-6】澱粉部分分解物（松谷化学工業株式会社製造、商品名パインデックス#4）40重量部を水60重量部に加熱溶解し、この溶液を45℃、pH6.5に調整した後、実施例A-1の方法で調製した非還元性糖質生成酵素を澱粉部分分解物グラム当たり1単位の割合になるように加えて96時間反応させ、次いで100℃に10分間加熱して、酵素を失活させた。本反応液を濃度約20%まで希釈し、グルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名グルコチーム）を澱粉部分分解物グラム当たり10単位加えて40時間反応させ、次いで加熱して酵素を失活させた。本溶液を、常法に従って、活性炭にて脱色し、イオン交換樹脂にて脱塩し、濃度約60%に濃縮した。本糖液中には固形物当たり29.5%のトレハロースを含有していた。分画用樹脂として、塩型強酸性カチオン交換樹脂（オルガノ株式会社販売、商品名CG6000、Na型）を用いた以外は、実施例A-2の方法に従ってカラムクロマトグラフィーを行い、トレハロース高含有画分を採取した。本高含有液は、固形物当たり約90%のトレハロースを含有していた。本溶液を濃度約75%に濃縮した後、助晶缶にとり、種晶としてトレハロース含水結晶約2%を加えて徐冷し、晶出率約45%のマスキットを得た。本マスキットを乾燥塔上のノズルより150kg/cm²の高圧にて噴霧した。これと同時に85℃の熱風を乾燥塔の上部より送風し、底部に設けた移送金網コンベア上に結晶粉末を捕集し、コンベアの下より45℃の温風を送りつつ、該粉末を乾燥塔外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成塔に充填して温風を送りつつ、10時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、トレハロース含水結晶粉末を得た。

【0121】本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱い

が容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定化剤、賦形剤などとして飲食物、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0122】

【実施例A-7】馬鈴薯澱粉1重量部を澱粉当たり0.01w/w%の割合にα-アミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名ネオスピターゼ）を含む水6重量部に攪拌混合し、pH6.0に調整後、この懸濁液を85乃至90℃に保ち、糊化と液化を同時に起こさせ、直ちに120℃に5分間加熱して、DE1.0未満にとどめ、これを55℃に急冷し、pH7.0に調整し、これに株式会社林原生物化学研究所製造、商品名ブルナーゼ（EC 3.2.1.41）および実施例A-3で述べたマルトテトラオース生成アミラーゼをそれぞれ澱粉グラム当たり150単位および8単位の割合で加え、pH7.0、50℃で36時間反応させた。

【0123】この反応液を、オートクレーブ（120℃）を10分間行い、次いで、45℃に冷却し、これに実験13の方法で調製したプレビバクテリウム・ヘロボルムATCC11822由来の非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり2単位の割合になるよう加え、64時間反応させた。この反応液を95℃で10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型、OH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して、噴霧乾燥して非還元性糖質含有粉末を固形物当たり収率約90%で得た。

【0124】本品は、DE 11.2であって、非還元性糖質を、固形物当たり、PI 2.9%、PII 61.5%およびPIII 0.8%を含有しており、温和で上品な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0125】

【実施例A-8】アルスロバクター・スピーシーズ Q 36（FERM BP-4316）を実験9の方法に準じて、ファーメンターで約72時間培養した。培養液を遠心分離して除菌し、上清をUF膜で約10倍に濃縮し、本発明の非還元性糖質生成酵素濃縮液（約15.2単位/ml）を回収した。

【0126】30%とうもろこし澱粉乳を用いて、実施例A-3の方法に準じて、α-アミラーゼ（ノボ社製造）、マルトテトラオース生成アミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）およびα-アミラーゼ（上田化学株式会社製造）を作用させ、オートクレーブ（120℃）処理し、次いで、45℃に冷却し、これに上記の方法で調製した非還元性糖質生成酵素を澱粉グラム当たり2単位になるよう加え、64時間反応させた。次いで100℃に10分間加熱して酵素を失活させた。本反応液を、実施例A-6の方法に準じて、グルコアミラーゼ

(ナガセ生化学工業株式会社製造)を作用させ、脱色、脱塩して濃度約60%に濃縮した。本糖液中には、固形物当たり約25%のトレハロースを含有していた。本糖液を実施例A-6の方法に準じて塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行い、トレハロース高含有画分を採取した。本高含有液は、固形物当たり約95%のトレハロースを含有していた。本溶液を蒸発釜にとり、減圧下で煮詰め、水分約4.0%のシラップとし、助晶機に移し、これに種晶として無水結晶トレハロースをシラップ固形物当たり1%加え、95℃で5分間攪拌助晶し、次いで、アルミ製バットに取り出し、100℃で6時間晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎し、流動乾燥して、水分約0.3%の無水結晶トレハロース粉末を得た。

【0127】本品は、食品、医薬品、化粧品、その原材料、または加工中間物などの含水物の脱水剤としてのみならず、上品な甘味を有する白色粉末甘味料としても有利に利用できる。

【0128】

【実施例B-1 甘味料】実施例A-4の方法で得た非還元性糖質高含有粉末1重量部に、 α -グリコシルステビオシド(東洋精糖株式会社販売、商品名 α Gスイート)0.01重量部およびL-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル(味の素株式会社販売、商品名アスパルテム)0.01重量部を均一に混合し、顆粒成型機にかけて、顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約2倍の甘味度を有し、甘味度当たりカロリーは、蔗糖の約1/2に低下している。

【0129】本甘味料は、それに配合した高甘味度甘味物の分解もなく、安定性に優れており、低カロリー甘味料として、カロリー摂取を制限している肥満者、糖尿病患者などのための低カロリー飲食物などに対する甘味付に好適である。

【0130】また、本甘味料は、虫歯誘発菌による酸の生成が少なく、不溶性グルカンの生成も少ないことより、虫歯を抑制する飲食物などに対する甘味付にも好適である。

【0131】

【実施例B-2 ハードキャンディー】濃度55%蔗糖溶液100重量部に実施例A-3の方法で得た非還元性糖質含有シラップ30重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分2%未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸1重量部および適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成型し、製品を得た。

【0132】本品は、歯切れ、呈味良好で、蔗糖の晶出、変形も起こらない高品質のハードキャンディーである。

【0133】

【実施例B-3 チューインガム】ガムベース3重量部

を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに蔗糖4重量部および実施例A-6の方法で得たトレハロース含水結晶粉末3重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。

【0134】本品は、テクスチャー、風味とも良好なチューインガムである。

【0135】

【実施例B-4 加糖練乳】原乳100重量部に実施例A-1の方法で得た非還元性糖質含有シラップ3重量部および蔗糖1重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱殺菌し、次いで濃度70%に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品を得た。

【0136】本品は、温和な甘味で、風味もよく、乳幼児食品、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。

【0137】

【実施例B-5 乳酸菌飲料】脱脂粉乳175重量部、実施例A-2の方法で得た非還元性糖質高含有粉末80重量部および特開平4-281795号公報で開示されているラクトスクロース高含有粉末50重量部を水1,200重量部に溶解し、65℃で30分間殺菌し、40℃に冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスターターを30重量部接種し、37℃で8時間培養して乳酸菌飲料を得た。

【0138】本品は、風味良好な乳酸菌飲料である。また、本品は、オリゴ糖を含有し、乳酸菌を安定に保持するだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用をも有する。

【0139】

【実施例B-6 粉末ジュース】噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末33重量部に対して、実施例A-2の方法で得た非還元性糖質高含有粉末50重量部、蔗糖10重量部、無水クエン酸0.65重量部、リンゴ酸0.1重量部、L-アスコルビン酸0.1重量部、クエン酸ソーダ0.1重量部、ブルラン0.5重量部、粉末香料適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にしてこれを流動層造粒機に仕込み、排風温度40℃とし、これに、実施例A-1の方法で得た非還元性糖質含有シラップをバインダーとしてスプレーし、30分間造粒し、計量、包装して製品を得た。

【0140】本品は、果汁含有率約30%の粉末ジュースである。また、本品は異味、異臭がなく、長期に安定であった。

【0141】

【実施例B-7 カスタードクリーム】コーンスターチ100重量部、実施例A-3の方法で得た非還元性糖質含有シラップ100重量部、マルトース80重量部、蔗糖20重量部および食塩1重量部を十分に混合し、鶏卵280重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳1,000重量部を徐々に加え、更に、これを火にかけて攪

10

20

30

40

50

拌を続け、コーンスターチが完全に糊化して全体が半透明になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。

【0142】本品は、なめらかな光沢を有し、温和な甘味で美味である。

【0143】

【実施例B-8 あん】原料あずき10重量部に、常法に従って、水を加えて煮沸し、渋切り、あく抜きして、水溶性夾雑物を除去して、あずきつぶあん約21重量部を得た。この生あんに、蔗糖14重量部、実施例A-3 10の方法で得た非還元性糖質含有シラップ5重量部および水4重量部を加えて煮沸し、これに少量のサラダオイルを加えてつぶあんをこわさないように練り上げ、製品のあんを約35重量部得た。

【0144】本品は、色焼けもなく、舌ざわりもよく、風味良好で、あんパン、まんじゅう、だんご、もなか、氷菓などのあん材料として好適である。

【0145】

【実施例B-9 パン】小麦粉100重量部、イースト2重量部、砂糖5重量部、実施例A-7の方法で得た非還元性糖質含有粉末1重量部および無機フード0.1重量部を、常法に従って、水でこね、中種を26℃で2時間発酵させ、その後30分間熟成し、焼き上げた。

【0146】本品は、色相、すだちともに良好で適度な弾力、温和な甘味を有する高品質のパンである。

【0147】

【実施例B-10 ハム】豚もも肉1,000重量部に食塩15重量部および硝酸カリウム3重量部を均一にすり込んで、冷室に1昼夜堆積する。これを水500重量部、食塩100重量部、硝酸カリウム3重量部、実施例A-7の方法で得た非還元性糖質含有粉末40重量部および香辛料からなる塩漬液に冷室で7日間漬け込み、次いで、常法に従い、冷水で洗浄し、ひもで巻き締め、燻煙し、クッキングし、冷却包装して製品を得た。

【0148】本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

【0149】

【実施例B-11 粉末ペプチド】40%食品用大豆ペプチド溶液（不二製油株式会社製造、商品名ハイニース）1重量部に、実施例A-6の方法で得たトレハロース含水結晶粉末2重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、50℃で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。

【0150】本品は、風味良好で、プレミックス、冷菓などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。

【0151】

【実施例B-12 粉末卵黄】生卵から調製した卵黄をプレート式加熱殺菌機で60乃至64℃で殺菌し、得ら

れる液状卵黄1重量部に対して、実施例A-8の方法で得た無水結晶トレハロース粉末4重量部の割合で混合した後バットに移し、一夜放置して、トレハロース含水結晶に変換させてブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、粉末卵黄を得た。

【0152】本品は、プレミックス、冷菓、乳化剤などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。また、美肌剤、育毛剤などとしても有利に利用できる。

【0153】

【実施例B-13 化粧用クリーム】モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-2の方法で得た非還元性糖質高含有粉末2重量部、 α -グリコシル ルチン1重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリル10重量部および防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸2重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部および精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合しクリームを製造した。

【0154】本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

【0155】

【実施例B-14 固体製剤】ヒト天然型インターフェロン- α 標品（株式会社林原生物化学研究所製造、コスモ・バイオ株式会社販売）を、常法に従って、固定化抗ヒトインターフェロン- α 抗体カラムにかけ、該標品に含まれるヒト天然型インターフェロン- α を吸着させ、安定剤であるウシ血清アルブミンを素通りさせて除去し、次いで、pHを変化させて、ヒト天然型インターフェロン- α を実施例A-5の方法で得た高純度非還元性糖質粉末を5%含有する生理食塩水を用いて溶出した。

【0156】本液を精密濾過し、約20倍量の無水結晶マルトース粉末（株式会社林原商事販売、商品名ファイントース）に加えて脱水、粉末化し、これを打錠機にて打錠し、1錠（約200mg）当たりヒト天然型インターフェロン- α を約150単位含有する錠剤を得た。

【0157】本品は、舌下錠などとして、一日当たり、大人1乃至10錠程度が経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リウマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの治療に有利に利用できる。とりわけ、近年、患者数の急増しているエイズ、肝炎などの治療剤として有利に利用できる。本品は、本発明の非還元性糖質と無水結晶マルトースが共に安定剤として作用し、室温で放置してもその活性を長期間よく維持する。

【0158】

【実施例B-15 糖衣錠】重量150mgの素錠を芯剤とし、これに実施例A-6の方法で得たトレハロース

含水結晶粉末40重量部、プルラン(平均分子量20万)2重量部、水30重量部、タルク25重量部および酸化チタン3重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量が約230mgになるまで糖衣し、次いで、同じトレハロース含水結晶粉末65重量部、プルラン1重量部および水34重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢の在る外観の優れた糖衣錠を得た。

【0159】本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

【0160】

【発明の効果】上記から明らかなように、本発明の新規非還元性糖質生成酵素は、温和な酵素反応条件下で還元性の澱粉部分分解物をそのグルコース重合度を変えずに非還元性糖質に高収率で変換する。その非還元性糖質の分離、精製も容易であり、このようにして得られる非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびこれらから製造されるトレハロースは安定性に優れ、良質で上品な甘味を有している。また、経口摂取により消化吸収され、カロリー源となる。非還元性糖質、これを含む低還元性糖質およびトレハロースは、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物の製造に有利に利用できる。

【0161】従って、本発明の確立は、安価で無限の資源である澱粉に由来する澱粉部分分解物から、従来、望むべくして容易に得られなかったトレハロース構造を有する非還元性糖質、これを含む低還元性糖質、およびこ

れから容易に製造されるトレハロースを、工業的に大量かつ安価に供給できる全く新しい道を拓くこととなり、それが与える影響の大きさは、澱粉科学、酵素科学、生化学などの学問分野は言うに及ばず、産業界、とりわけ食品、化粧品、医薬品分野は勿論のこと、農水畜産業、化学工業にも及び、これら産業界に与える工業的意義は計り知れないものがある。

【図面の簡単な説明】

【図1】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図2】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図3】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

【図4】リゾビウム・スピーシーズ M-11由来の非還元性糖質生成酵素のpH安定性を示す図である。

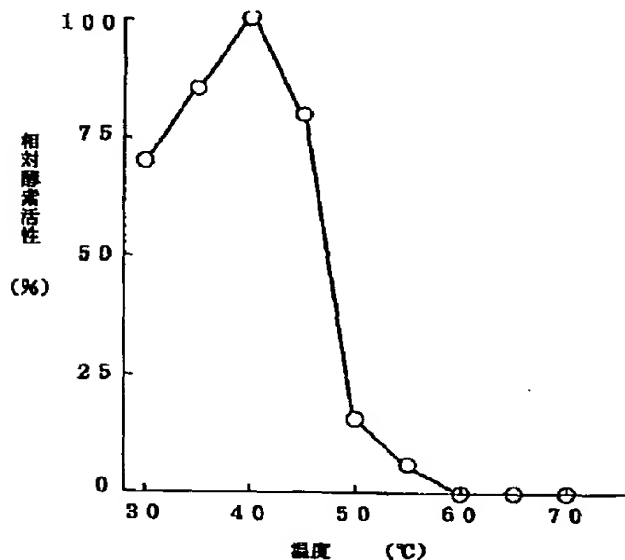
【図5】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図6】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素の活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

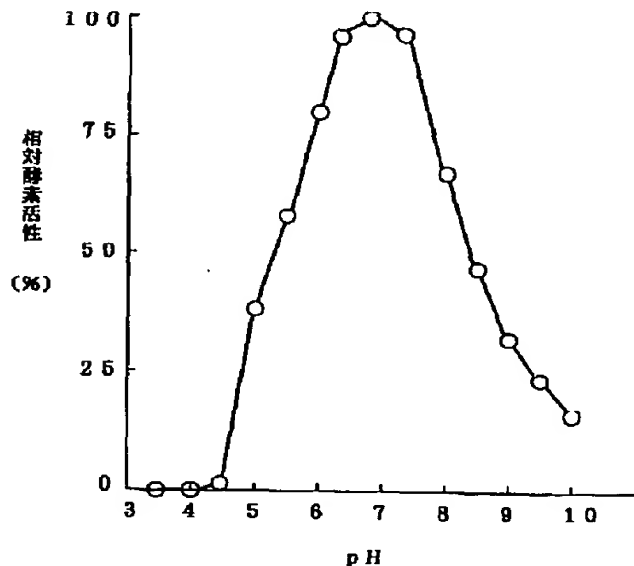
【図7】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

【図8】アルスロバクター・スピーシーズ Q36由来の非還元性糖質生成酵素のpH安定性を示す図である。

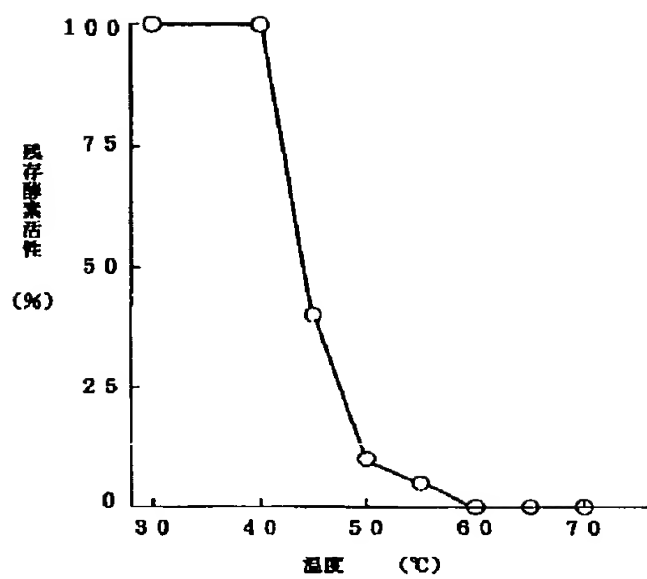
【図1】



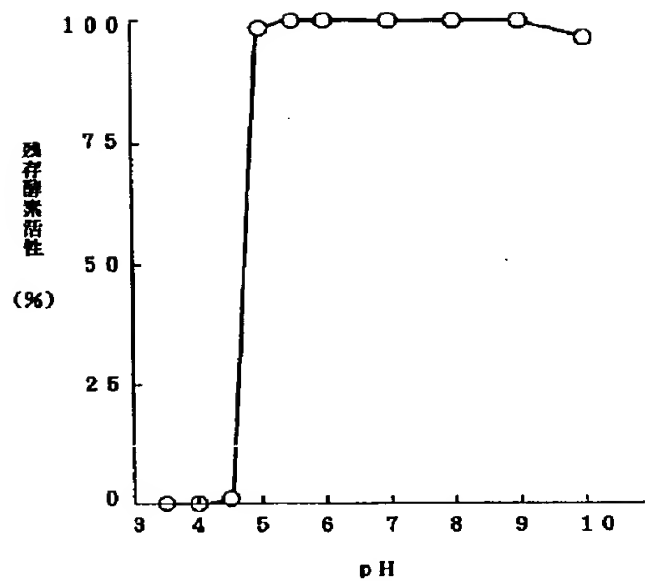
【図2】



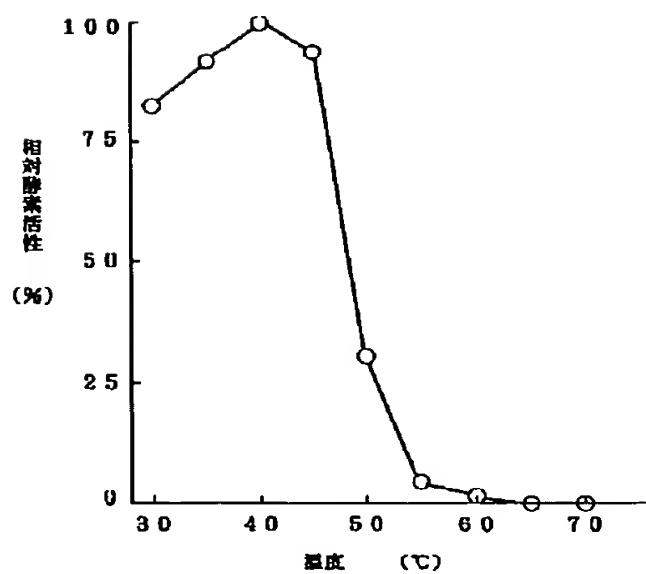
【図3】



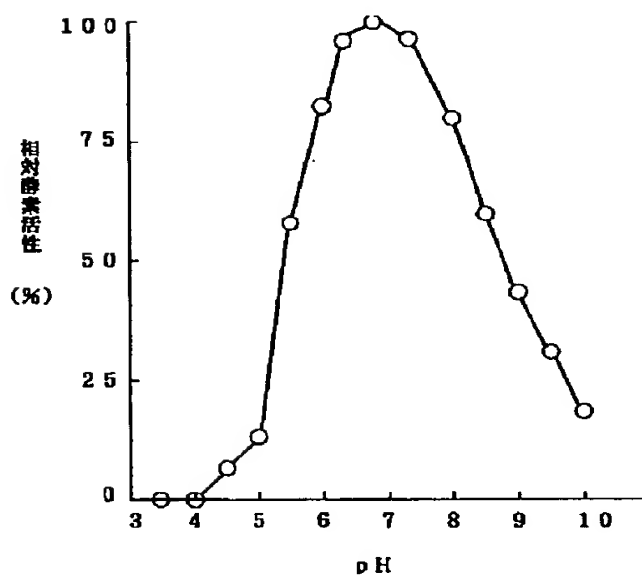
【図4】



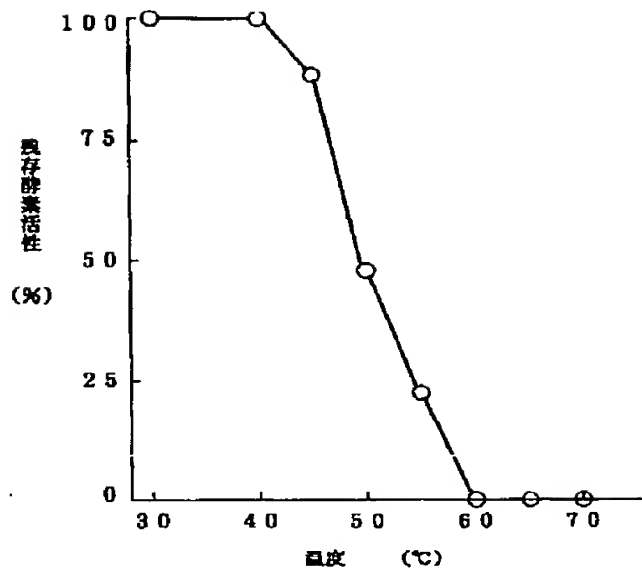
【図5】



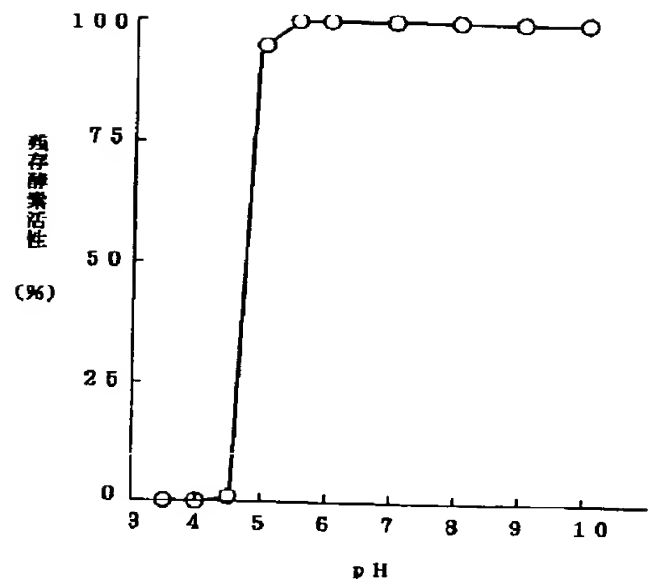
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁸

C12P 19/14

//(C12N 9/24

C12R 1:41)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

Z 7432-4B